

**Univerzita Karlova  
1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA  
1. lékařská fakulta**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Analýza prognostických znaků u pacientů s karcinomem  
prsů a kolorektálním karcinomem**

**Analysis of prognostic features in patients with breast cancer and  
colorectal cancer**

**MUDr. Michal Vočka**

**Školitel: prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.**

Praha 2019

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne 24. června 2019

Michal Vočka

**Identifikační záznam:**

VOČKA, Michal. *Analýza prognostických znaků u pacientů s karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem. [Analysis of prognostic features in patients with breast cancer and colorectal cancer]*. Praha, 2019. Počet stran: 67, počet příloh: 7. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Onkologická klinika. Vedoucí závěrečné práce Petruželka, Luboš.

## **Poděkování:**

Chtěl bych velice poděkovat prof. MUDr. Luboši Petruželkovi, CSc. za možnost realizovat své postgraduální studium na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN, za praktická témata, cenné rady v průběhu studia, podporu a odborný dohled v průběhu mého studia.

Dále bych chtěl poděkovat prof. MUDr. Zdeňkovi Kleiblovi, PhD. za dlouhé, podnětné diskuse nad výsledky, pomoc a rady při realizaci publikačních výstupů, nekonečnou trpělivost a velkou důvěru.

Stejně tak bych chtěl poděkovat všem kolegům z klinických i výzkumných pracovišť, se kterými jsem měl v průběhu svého studia možnost spolupracovat a získávat cenné zkušenosti.

Práce byla podpořena granty Agentury pro zdravotnický výzkum MZČR 15-28188A, NV15-28830A, NV-16-29959A, 16-30954A, 762216, NV18-03-00024, NV19-03-00279; Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR FR-TI3/666; MH CZ - DRO VFN 64165; projekty Univerzity Karlovy PROGESQ28/LF1, GAUK 762216, SVV2019/260367 a UNCE/MED/016.

## ABSTRAKT

Nádorová onemocnění patří mezi druhou nejčastější příčinu úmrtí v ČR. Mezi nejčastější patří karcinomy prsu a kolorekta. Hledání prognostických faktorů umožňujících lepší rozhodování o postupu léčby je jednou z klíčových otázek klinického výzkumu v onkologii.

Nosiči mutací v genech predisponujících k dědičné formě karcinomu prsu tvoří malou, ale klinicky významnou skupinu vysoce rizikových osob. Zavedení NGS v posledních letech umožňuje zrychlení analýz predispozičních genů. Množství informací o přítomnosti patogenních mutací v predispozičních genech je v ostrém kontrastu s pouze velmi malým množstvím údajů o jejich vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám nádorů u jejich nosičů. Obtíže způsobuje rovněž určení míry rizika vzniku nádorových onemocnění u nosičů vzácných mutací a variant nejasného významu v genech s neúplnou penetrancí. K řešení těchto problémů jsme se pokusili přispět zavedením jednotného přístupu NGS analýz u pacientek s karcinomem prsu, charakterizací významu prognostických faktorů u nosiček mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1/BRCA2* a určením rizik spojených se vznikem karcinomu prsu u nosičů genu.

Kolorektální karcinom představuje zdánlivě histologicky homogenní onemocnění. Na molekulární úrovni však vytváří subtypy, které se odlišují značně rozdílnou prognózou. Stratifikace pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem na základě biochemických markerů v séru umožňuje identifikovat nemocné vhodné pro radikální resekcční výkony v oblasti jater event. v kombinaci s resekcemi primární tumoru. V naší práci jsme se zaměřili na identifikaci biochemických markerů, které umožňují identifikovat pacienty s velmi špatnou prognózou a malým benefitem z kombinované terapie. U pacientů s lokalizovanými kolorektálními karcinomy jsme se podíleli na kvalitativním a kvantitativním vyhodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů (Immunoscore), které je důležitým prognostickým ukazatelem odhadu rizika relapsu onemocnění.

### **Klíčová slova:**

karcinom prsu, kolorektální karcinom, prognóza, estrogení receptor, TFF-3, GDF-15, Immunoscore

## ABSTRACT

Cancers represent second the most common cause of death in the Czech Republic. The most common are breast and colorectal cancers. Identification of prognostic factors improving decision-making approaches for treatment optimization belongs to the key aims of clinical research in oncology.

Carriers of mutation in cancer-susceptibility genes represent a small but clinically important group of high-risk patients. The implementation of NGS have accelerated predisposing genes analyses. The large extent of data about the presence of variants in predisposing genes is in striking contrast to only a very limited information available about clinico-pathological characteristics of mutation carriers. Determination of the risk of tumor development in carriers of rare mutations or variants of unclear significance in genes with incomplete penetrance represent substantial drawbacks of current NGS analyses. To address these issues, we have attempted i) to introduce a unified approach to NGS analysis in breast cancer patients, ii) to characterize importance of prognostic factors in BRCA1/BRCA2 mutation carriers, and iii) to identify the cancer risks in carriers of germline mutations in the CHEK2 gene.

Colorectal cancer represents seemingly histologically homogeneous disease. However, at the molecular level it can be divided into distinct subtypes differing in prognosis. Stratification of patients with metastatic colorectal cancer on the basis of serum biochemical markers allows to identify patients suitable for radical liver resection with/without primary tumor resections. In our work, we have focused on the identification of novel biochemical markers allowing to identify patients with very poor prognosis and little benefit from combined therapy. In patients with localized colorectal carcinomas, we participated in the qualitative and quantitative evaluation of the presence of tumor infiltrating lymphocytes (Immunoscore), which is an important prognostic indicator of the risk of relapsed disease.

### **Keywords:**

breast cancer, colorectal cancer, prognosis, estrogen receptor, TFF-3, GDF-15, Immunoscore

# OBSAH

1	Úvod.....	12
1.1	Epidemiologie .....	12
1.1.1	Karcinom prsu (C50).....	12
1.1.2	Kolorektální karcinom (C18-20).....	13
1.2	Nádorové charakteristiky .....	14
1.2.1	Karcinom prsu (C50).....	14
1.2.1.1	Karcinomy in situ .....	15
1.2.1.2	Invazivní karcinomy.....	15
1.2.1.3	Grading a imunohistochemické vyšetření .....	15
1.2.1.4	Klasifikace podle profilů genové exprese .....	18
1.2.2	Kolorektální karcinom (C18-20).....	19
1.2.2.1	Invazivní karcinomy.....	19
1.2.2.2	Molekulární testování.....	19
1.2.2.3	Tumor infiltrující lymfocyty .....	21
1.3	Hereditární nádorové syndromy.....	22
1.3.1	Studium podstaty hereditárních nádorových onemocnění.....	23
1.3.2	Nejčastější hereditární nádorové syndromy.....	25
1.3.2.1	Hereditární karcinom prsu .....	25
1.3.2.2	Hereditární kolorektální karcinom .....	27
1.3.3	Preventivní opatření .....	28
2	Východiska a cíle práce .....	31
3	Seznam prací sloužících jako podklad dizertační práce .....	33
4	Komentář k vybraným publikovaným pracím.....	37
4.1	Článek 1: Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in <i>BRCA1/BRCA2/PALB2</i> -negatively tested breast cancer patients. ....	37
4.2	Článek 2: Validation of CZECA (Czech CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS – based analysis of hereditary cancer syndromes. ....	39
4.3	Článek 3: Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in <i>BRCA1/BRCA2</i> Mutation Carriers Versus Non-Carriers.....	41
4.4	Článek 4: Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. ....	45
4.5	Článek 5: Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer.....	49

4.6	Článek 6: Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) as new potential serum marker in patients with metastatic colorectal cancer.....	51
4.7	Článek 7: International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study.....	53
5	Závěr .....	56
6	Literatura.....	62
7	Přílohy – vybrané publikované práce <i>in extenso</i>	



## SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam
AKT/PKB	<u>A</u> KT kináza/protein kináza <u>B</u>
<i>APC</i>	gen <u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli
APC	antigen prezentující buňka ( <u>A</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell)
ATM	protein kódovaný genem <i>ATM</i> ( <u>a</u> taxia <u>t</u> elangiectasia <u>m</u> utated)
AUC	plocha pod křivkou ( <u>a</u> rea <u>u</u> nder the <u>c</u> urve)
BARD1	protein kódovaný genem <i>BARD1</i> ( <u>B</u> RCA1-associated <u>R</u> ING <u>d</u> omain 1)
BLM	protein kódovaný genem <i>BLM</i> ( <u>B</u> loom syndrom)
<i>BMPRIA</i>	gen <u>B</u> one <u>M</u> orphogenetic <u>P</u> rotein <u>R</u> eceptor Type <u>1A</u>
<i>BRCA1</i>	gen <u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>1</u> , early onset
<i>BRCA2</i>	gen <u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>2</u> , early onset
BRIP1	protein kódovaný genem <i>BRIP1</i> ( <u>B</u> RCA1 interacting protein C-terminal helicase 1)
CA19-9	<u>c</u> luster <u>a</u> ntigen 19-9
CEA	karcinoembryonální antigen
<i>CDH1</i>	gen pro <u>c</u> adherin <u>1</u>
CI	konfidenční interval ( <u>c</u> onfidence <u>i</u> nterval)
CIMP	Fenotyp spojený s metylací CpG oblastí ( <u>C</u> pG <u>i</u> sland <u>m</u> ethylator phenotype)
CNV	variabilita počtu kopií ( <u>c</u> opy- <u>n</u> umber <u>v</u> ariation)
CRC	kolorektální karcinom ( <u>c</u> olorectal <u>c</u> ancer)
CYP	cytochrom P450
DCIS	duktální karcinom <i>in situ</i> ( <u>d</u> uctal <u>c</u> arcinoma <i>in situ</i> )
ddNTPs	2',3'-dideoxyribonukleotidy
DFS	přežití bez nemoci ( <u>D</u> isease <u>f</u> ree <u>s</u> urvival)
DNA	kyselina deoxyribonukleová ( <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
DSS	nádorově specifické přežití ( <u>D</u> isease <u>s</u> pecific <u>s</u> urvival)
EGF	epidermální růstový faktor ( <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB-1 čili HER1 ( <u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor receptor)
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
<i>EPCAM</i>	gen <u>E</u> pithelial <u>C</u> ell <u>A</u> dhesion <u>M</u> olecule
ER	<u>e</u> strogenový <u>r</u> eceptor
<i>ERBB2</i>	gen erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
EREs	estrogenové responzivní elementy ( <u>e</u> strogen <u>r</u> esponsive <u>e</u> lements)
ERα	estrogenový receptory alfa
ERβ	estrogenový receptory beta
FANCA-C	proteiny kódované geny <i>FANCA-C</i> ( <u>F</u> anconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>A-C</u> )
FANCD2	protein kódovaný genem <i>FANCD2</i> ( <u>F</u> anconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>D2</u> )
FANCE-G	proteiny kódované geny <i>FANCE-G</i> ( <u>F</u> anconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>E-G</u> )

FANCE-G	proteiny kódované geny <i>FANCE-G</i> (Fanconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>E-G</u> )
FANCI	protein kódovaný genem <i>FANCI</i> (Fanconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>I</u> )
FANCL	protein kódovaný genem <i>FANCL</i> (Fanconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>L</u> )
FANCM	proteiny kódované geny <i>FANCM</i> (Fanconi <u>A</u> nemia <u>C</u> omplementation Group <u>M</u> )
<i>FANCD2</i>	gen Fanconi <u>a</u> nemia, <u>c</u> omplementation group <u>D2</u>
GAPPS	syndrom karcinomu žaludku a proximální polypózy žaludku ( <u>G</u> astric <u>a</u> denokarcinoma and <u>p</u> roximal <u>p</u> olyposis of the <u>s</u> tomach syndrom)
GDF-15	<u>G</u> rowth/ <u>d</u> ifferentiation <u>f</u> actor <u>15</u>
FAP	familiární adenomatózní polypóza
HBOC	syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovárií ( <u>h</u> ereditary <u>b</u> reast and <u>o</u> varian <u>c</u> ancer syndrom)
HER1	receptor pro lidský epidermální růstový faktor, též EGFR či ErbB-1 ( <u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor <u>r</u> eceptor)
HER2	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili ErbB-2 ( <u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor <u>r</u> eceptor 2)
HER3	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 3 čili ErbB-3 ( <u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor <u>r</u> eceptor 3)
HER4	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 4 čili ErbB-4 ( <u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth factor <u>r</u> eceptor 4)
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom ( <u>H</u> ereditary <u>n</u> on- <u>p</u> olyposis <u>c</u> olorectal <u>c</u> ancer)
HR	hazard ratio
<i>CHEK2</i>	gen pro <u>c</u> heckpoint <u>k</u> inase <u>2</u>
CHK2	<u>c</u> heckpoint <u>k</u> ináza <u>2</u> ; proteinový produkt genu <i>CHEK2</i>
K-RAS	protein kódovaný genem <i>Kras</i> ( <u>K</u> <u>r</u> at <u>s</u> arcoma oncogene)
Ki67	antigen Ki67
LCIS	lobulární karcinom <i>in situ</i> ( <u>l</u> obular <u>c</u> arcinoma <u>i</u> n <u>s</u> itu)
MAP	<i>MUTYH</i> -asociovaná polypóza
MAP kináza	mitogenem aktivované kináza (mitogen-activated protein kinase)
<i>MLH1</i>	gen <u>M</u> ut <u>L</u> <u>h</u> omolog <u>1</u>
MMG	mamografie
MMR	oprava chybného párování bazí (mismatch repair)
MRE11	protein MRE11
MRI	nukleární magnetická rezonance ( <u>m</u> agnetic <u>r</u> esonance <u>i</u> maging)
MRN	<u>M</u> RE11/ <u>R</u> AD50/ <u>N</u> BN komplex
MSI	<u>m</u> ikro <u>s</u> atelitová <u>i</u> nstabilita
NBN	protein kódovaný genem nibrin čili <i>NBS1</i> ( <u>N</u> ijmegen <u>b</u> reakage <u>s</u> yndrom 1)
<i>NF1</i>	gen <u>n</u> euro <u>f</u> ibromin <u>1</u>
NGS	<u>n</u> ext-generation <u>s</u> equencing
MLPA	<u>m</u> ultiplex <u>l</u> igation-dependent <u>p</u> robe <u>a</u> mplification
mOS	medián celkové přežití (median of overall <u>s</u> urvival)
<i>MSH-2</i>	gen <u>M</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog <u>2</u>
<i>MSH-6</i>	gen <u>M</u> ut <u>S</u> <u>H</u> omolog <u>6</u>
<i>MUTYH</i>	gen <u>M</u> ut <u>Y</u> DNA Glycosylase

N-RAS	protein kódovaný genem <i>Nras</i> ( <u>N</u> <u>rat</u> <u>sarcoma</u> oncogene)
p	hodnota p
p53	protein p53
PALB2	protein kódovaný genem <i>PALB2</i> ( <u>P</u> artner and <u>L</u> ocaliser of <u>B</u> RCA <u>2</u> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PD-1	receptor programované smrti 1 ( <u>p</u> rogramed cell <u>d</u> eath <u>1</u> )
PD-L1	ligand receptoru PD-1 ( <u>p</u> rogramed cell <u>d</u> eath <u>l</u> igand <u>1</u> )
<i>PMS1</i>	gen <u>P</u> MS1 Homolog <u>1</u>
<i>PMS2</i>	gen <u>P</u> MS1 Homolog <u>2</u>
PR	progesteronový receptor
PTEN	protein kódovaný genem <i>PTEN</i> ( <u>p</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog)
RAD50	protein kódovaný genem <i>RAD50</i> ( <u>R</u> adiation sensitive 50)
RAD51	protein kódovaný genem <i>RAD51</i> ( <u>R</u> adiation sensitive 51)
RAD51C	protein kódovaný genem <i>RAD51C</i> ( <u>R</u> adiation sensitive 51C)
RAD51D	protein kódovaný genem <i>RAD51D</i> ( <u>R</u> adiation sensitive 51D)
RAS	protein kódovaný genem <i>Ras</i> ( <u>r</u> at <u>s</u> arcoma oncogene)
Rb	retinoblastom
ROC	receiver operating characteristic curve
RR	relativní riziko
SNP	bodový polymorfismus ( <u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism)
SNV	jednonukleotidové záměny ( <u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>v</u> ariation)
SOLiD	Sekvenování oligonukleotidovou liagací a detcí ( <u>S</u> equencing by <u>O</u> ligonucleotide <u>L</u> igation and <u>D</u> etection)
<i>SMAD4</i>	gen <u>S</u> MA <u>D</u> family member <u>4</u>
<i>STK11</i>	gen <u>S</u> erine/ <u>T</u> hreonine <u>K</u> inase <u>11</u>
TFF	trefoil factor family
TGFβ	transforming growth factor <u>β</u>
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz ( <u>t</u> umor, <u>n</u> odi, <u>m</u> etastasis)
TP53	protein kódovaný genem <i>TP53</i> ( <u>t</u> umor protein <u>p</u> 53)
UZ	ultrazvuk
VUS	varianty nejasného významu ( <u>v</u> ariants of <u>u</u> ncertain <u>s</u> ignificance)
WHO	Světová zdravotnická organizace ( <u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization)
<i>WRN</i>	gen <u>W</u> erner Syndrome RecQ Like Helicase
XRCC2	protein kódovaný genem <i>XRCC2</i> ( <u>X</u> -Ray Repair Cross Complementing 2)
XRCC3	protein kódovaný genem <i>XRCC3</i> ( <u>X</u> -Ray Repair Cross Complementing 3)
ZN	zhoubný novotvar

# 1 ÚVOD

## 1.1 Epidemiologie

Nádorová onemocnění jsou v České republice (ČR) druhou nejčastější příčinou úmrtnosti. Ročně na nádorová onemocnění umírá více než 27 tisíc osob, což představuje 23 % z celkové úmrtnosti, zároveň jsou druhou nejzávažnější příčinou nemoci ekonomicky aktivní části obyvatelstva.

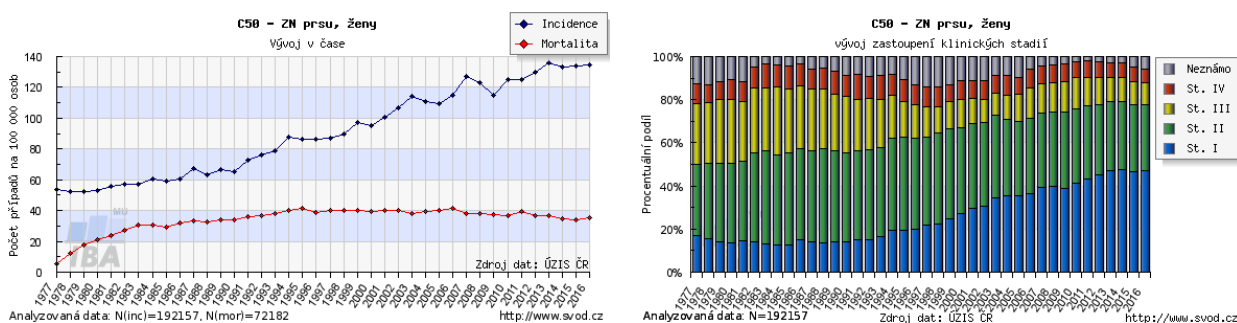
Každoročně onemocní v ČR více než 96 500 lidí zhoubným novotvarem (data za rok 2016) a zároveň více než 27 000 lidí zemře v souvislosti s nádorovým onemocněním. Mimoto je potřeba si uvědomit, že v roce 2016 žilo v ČR téměř 562 329 osob, u kterých bylo v průběhu jejich života diagnostikováno onkologické onemocnění. Mezi nejčastější nádorová onemocnění patří u žen karcinom prsu (11,4 %) a u mužů karcinom prostaty (14,1 %), dále pak karcinom plic (10,0 %) a kolorektální karcinom (12,0 %). ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)

### 1.1.1 Karcinom prsu (C50)

Celosvětově bylo v roce 2018 diagnostikováno 2,09 milionu nových případů karcinomu prsu (což tvoří 11,6 % všech nádorových onemocnění), zároveň bylo v téže roce zaznamenáno 630 tisíc úmrtí v souvislosti s touto diagnózou (Bray F. et al, 2018).

V ČR bylo v roce 2016 diagnostikováno 7220 nových případů (134,4 / 100 000 žen), tedy 11,4 % všech hlášených onkologických onemocnění. V celosvětovém měřítku nám patří 19. místo v incidenci karcinomu prsu. Incidence karcinomu prsu, podobně jako ve všech západních zemích, setrvale roste ([obrázek 1A](#)). V roce 1986 bylo diagnostikováno 3236 (61,8 na 100 000 žen), 4582 v roce 1996 (86,4 na 100 000 žen) a 6033 v roce 2006 (114,8 na 100 000 žen). Za posledních 30 let se tedy počet případů více než zdvojnásobil. Příznivým trendem je zvyšující se podíl pacientek diagnostikovaných v časném klinickém stádiu. Stádium I a II tvořilo 62,0 % v roce 1996, 71,1 % v roce 2006 a 77,6 % v roce 2016 ([obrázek 1B](#)). Časový vývoj zastoupení klinických stadií je ovlivněn zavedením plošného mammografického screeningu v září 2002 nebo postupně implementovanými změnami v metodice TNM klasifikace. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)

**Obrázek 1: A.** Časový vývoj incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) pro diagnózu karcinomu prsu u žen v České republice (ČR); **B.** Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stádií karcinomu prsu u žen v ČR. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)



Mortalita na rozdíl od zvyšující se incidence stagnuje (obrázek 1A). V roce 2016 zemřelo v souvislosti s karcinomem prsu 1907 patientek (35,5 na 100 000 žen). V roce 1986 zemřelo 1715 patientek (32,2 na 100 000 žen), 2051 v roce 1996 (38,7 na 100 000 žen) a 2173 v roce 2006 (41,8 na 100 000 žen). Důležité je zmínit, že při dvojnásobném zvýšení incidence v posledních 30 letech, zůstala mortalita prakticky stejná. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)

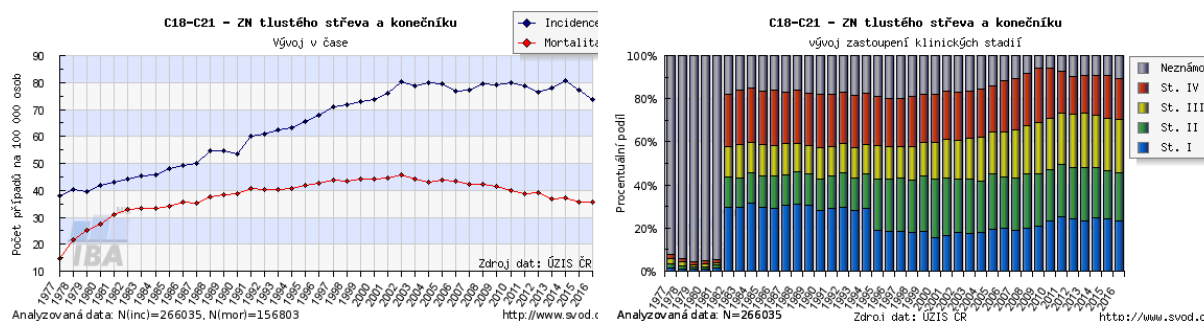
### 1.1.2 Kolorektální karcinom (C18-20)

Kolorektální karcinom je třetím nejčastějším nádorovým onemocněním. Celosvětově bylo v roce 2018 diagnostikováno 1,85 milionu nových případů (což tvoří 10,2 % všech nádorových onemocnění), zároveň bylo v roce 2018 zaznamenáno 880 tisíc úmrtí v souvislosti s kolorektálním karcinomem (Bray F. et al, 2018).

V ČR bylo v roce 2016 diagnostikováno 7610 nových případů (72,0 / 100 000 žen), tedy 12,0 % všech hlášených onkologických onemocnění. V celosvětovém měřítku nám patří 5. místo v incidenci kolorektálního karcinomu. Incidence kolorektálního karcinomu, jež po řadu let vzrůstala, od roku 2002 stagnuje (obrázek 2A, graf zahrnuje i diagnózu C21 – ZN řitního kanálu, která představuje přibližně 200 nových případů ročně). V roce 1986 bylo diagnostikováno 4971 pacientů s kolorektálním karcinomem (48,1 na 100 000 obyvatel), 6926 v roce 1996 (67,1 na 100 000 obyvatel) a 7786 v roce 2006 (75,8 na 100 000 obyvatel). Za posledních 30 let se tedy počet případů více než zdvojnásobil, nicméně, jak již zmíněno výše, v posledních přibližně 15 letech incidence stagnuje. Na rozdíl od karcinomu prsu však nepozorujeme nijak zásadní změnu v podílu časných stádií (stádium I a II), která v roce 1996 tvořila 59,3 %, v roce 2006 43,9 % a v roce 2016 46,0 % pacientů. Zároveň došlo k

velmi mírnému snížení procenta pacientů ve stádiu IV, jež je charakterizované přítomností vzdálených metastáz (v roce 2016 se jednalo o 19,7 % pacientů, zatímco před 20 lety v roce 1996 o 22,6 %). (obrázek 2B, graf zahrnuje i diagnózu C21). Z prezentovaných dat je patrné, že kolorektální screening, který započal v lednu 2009, zatím nevedl k výraznějšímu snížení stádia v době diagnózy. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)

**Obrázek 2: A.** Časový vývoj incidence kolorektálního karcinomu (počet nových případů na 100 000 osob) a mortality (počet úmrtí v souvislosti s diagnózou na 100 000 osob) v České republice (ČR); **B.** Časový vývoj zastoupení jednotlivých klinických stádií kolorektálního karcinomu v ČR. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)



Mortalita kolorektálního karcinomu podobně jako jeho incidence v posledních přibližně 15 letech mírně klesá (obrázek 2A, graf zahrnuje i diagnózu C21). V roce 2016 zemřelo v souvislosti s kolorektálním karcinomem 3819 pacientů (34,8 na 100 000 obyvatel). V roce 1986 zemřelo 3603 pacientů (34,8 na 100 000 obyvatel), 4330 v roce 1996 (42,0 na 100 000 obyvatel) a 4417 v roce 2006 (43,0 na 100 000 obyvatel).

Incidence začíná narůstat po 50. roce života, čemuž odpovídá i věk zahájení screeningu kolorektálního karcinomu. Nejčastěji se kolorektální karcinom vyskytuje ve věkové kategorii 65 až 75 let. ([www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019)

## 1.2 Nádorové charakteristiky

### 1.2.1 Karcinom prsu (C50)

Karcinom prsu představuje histopatologicky značně heterogenní onemocnění s rozdílnými nádorovými charakteristikami, významně se lišící odpovědí na léčbu a celkovou prognózou onemocnění.

### **1.2.1.1 Karcinomy *in situ***

Karcinomy *in situ* jsou tvořeny maligními epiteliálními buňkami, které nepřestupují přes buněčnou membránu, a tvoří přibližně 10 % všech diagnostikovaných karcinomů prsu (v roce 2016 bylo v ČR diagnostikováno 650 pacientek, tedy 8,3 %; [www.SVOD.cz](http://www.SVOD.cz); data získaná 14.6.2019). K základním patologickým typům řadíme duktální karcinom *in situ* (DCIS) tvořící přibližně 80 % neinvazivních forem a lobulární karcinom *in situ* (LCIS). DCIS lze dále rozdělit do několika subtypů dle převažujícího charakteru růstu nádorových buněk (komedonový, papilární atd.), ve většině případů se však objevuje více strukturálních forem v jednom preparátu. LCIS bývá často multicentrický a multifokální, navíc až v 15 % případů se vyvíjí karcinom v kontralaterálním prsu (Page D.L. et al, 2003). Karcinomy *in situ* v sobě mohou skrývat okrsky invazivního karcinomu, který nebyl zachycen bioptickým vyšetřením.

### **1.2.1.2 Invazivní karcinomy**

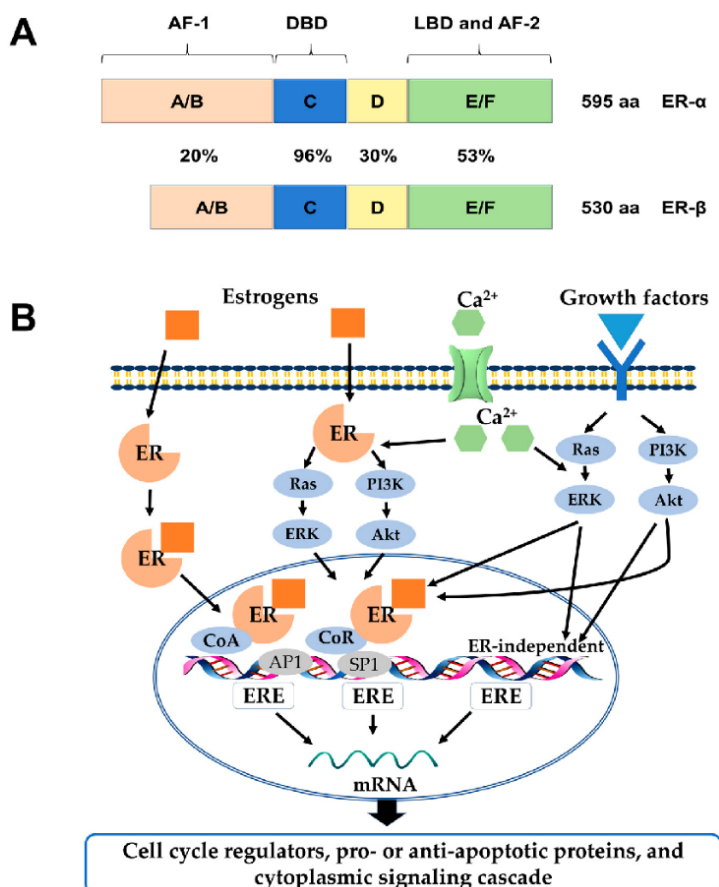
Invazivní karcinomy prsu jsou charakterizovány šířením maligních epiteliálních buněk do okolí a schopností vytvářet vzdálené metastázy. Aktuální WHO klasifikace (Sinn H.P., Kreipe H., 2013) rozlišuje: „invasive carcinoma of no special type” (NST, dříve duktální invazivní karcinom; přibližně 80 % všech invazivních karcinomů prsu), lobulární invazivní karcinom (20 %) a několik dalších histologických typů (tubulární, kribriformní, medulární, metaplastický, mucinózní atd.), jejichž četnost však v souhrnu nepřesahuje 5 %. Z méně častých histologických subtypů je důležité zmínit medulární karcinom, který je diagnostikován jen asi u 2-3 % všech karcinomů, nicméně mezi nosičkami mutace v genu *BRCA1* se vyskytuje ve významně vyšším zastoupení (až 13 %) (Lakhani S.R. et al, 2000, Matinez S.R. et al, 2011).

### **1.2.1.3 Grading a imunohistochemické vyšetření**

Stupeň diferenciaci nádorové tkáně (grade) je jednou z důležitých charakteristik karcinomu prsu. V současné době je využívána tzv. nottinghamská klasifikace, která zohledňuje tři morfologické parametry: tvorby tubulů, jaderné polymorfie a počet mitóz. Výsledné skóre udává nádorový grade 1-3, který slouží jako prognostický faktor (Elston C.W., Ellis I.O., 2002; Rakha E.A. et al, 2008).

Dále je standardně prováděno imunohistochemické vyšetření exprese steroidních hormonálních receptorů (estrogenové receptory - ER, progesteronové receptory - PR), exprese receptoru HER-2/neu a hodnota proliferačního indexu (Ki67). (Hammond M.E., 2011)

Estrogenový receptor se bezprostředně po svém objevení (Jensen E.V., Jacobson H.I., 1960) stal důležitým prognostickým faktorem a zároveň prediktivním faktorem odpovědi na hormonální terapii (Osborne C.K. et al, 1980; Samaan N.A. et al, 1981; Allred D.C. et al, 1998). Samotný receptor obsahuje několik domén. DNA vázající doména rozpoznává specifické oblasti promotorů cílových genů tzv. estrogenové responzivní elementy (EREs), transkripční domény umožňují interakci s transkripčním aparátem a dimerizační doména zprostředkuje dimerizaci ER. Vazba estrogenu na ER stimuluje buněčnou proliferaci aktivací transkripce řady genů s výrazným mitogenním potenciálem (**Obrázek 3**). Tuto aktivitu je možné modulovat řadou antagonistů či parciálních agonistů ER, jež jsou terapeuticky využívány v hormonální léčbě nádorů exprimujících ER. Absence ER je tak negativním prognostickým faktorem, který neumožňuje použití hormonální léčby. Podobně jako u ER představuje absence exprese progesteronového receptoru negativní prognostický faktor (Purdie C.A. et al, 2014).



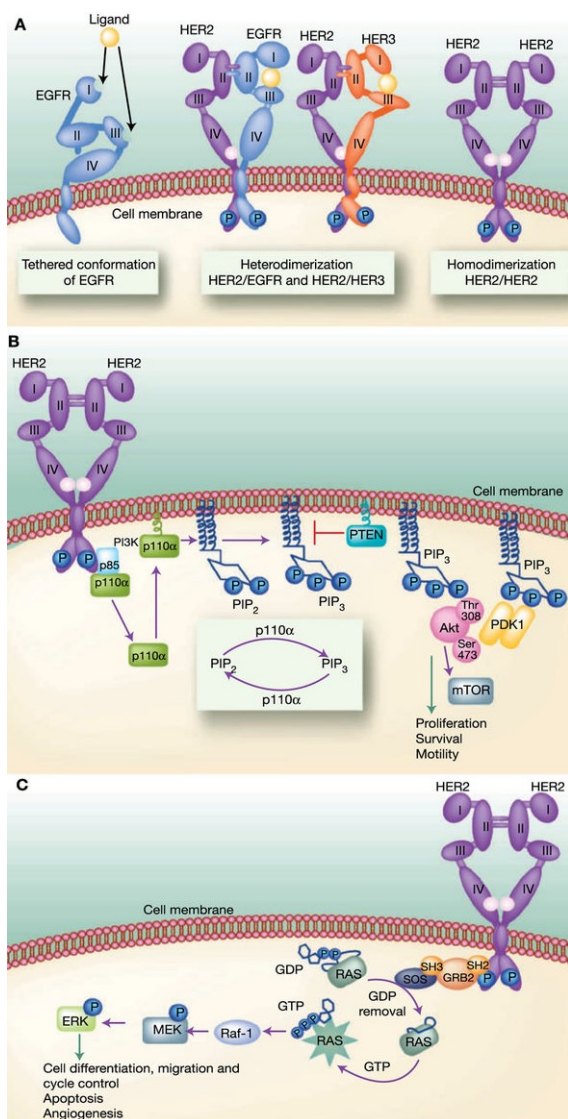
**Obrázek 3: Estrogenní receptor a jeho kaskáda.** (převzato z Rong C. et al, 2018)

**A. Strukturní a funkční domény estrogenního receptoru α a β** zahrnují 5 domén: funkční doména aktivující transkripci [A/B], DNA vázající doména [C], spojovací doména [D], doména pro vazbu ligandu [E-F], kdy F plní zároveň funkci aktivace transkripce podobně jako doména A). Procenta značí strukturní identitu.

**B. Schéma estrogenu aktivované signální kaskády** (receptor s navázaným ligandem se váže přímo na estrogenové responzivní elementy [ERE] a modifikuje expresi příslušných genů). Kromě kanonické dráhy aktivace ER jako transkripčního faktoru může ER v podobě membránově-asociované molekuly aktivovat i další signální dráhy, včetně MAP-kinázové kaskády či aktivace AKT/PKB.



Lidský receptor epidermálního růstového faktoru 2 (HER-2/neu) je transmembránový protein s tyrozinkináзовou aktivitou kódovaný genem *ERBB2*. HER-2 vytváří heterodimery s dalšími receptory z rodiny HER, mezi které patří receptor HER-1 (známý též jako EGFR) interagující s epidermálním růstovým faktorem (EGF) a receptory HER-3 a HER-4 vážící heregulin. HER-2 receptory jsou důležité pro mitotickou aktivaci epiteliálních buněk, která je po aktivaci receptorů zprostředkovávána cestou kanonické signalizace receptorů pro růstové faktory zahrnující MAP kinázovou kaskádu a aktivaci PKB/AKT (**Obrázek 4**). Zvýšená exprese proteinu HER-2 je diagnostikována u přibližně 20-25 % karcinomů prsu (Slamon D.J. et al, 1987; Tsuda H. et al, 2001; Owens M.A. et al, 2004). Zvýšená exprese HER-2 představuje negativní prognostický faktor, ale zároveň prediktivní faktor pro anti-HER-2 terapii (trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, trastuzumab-emtansin).



**Obrázek 4: Přehled struktury a funkce receptorů EGFR rodiny** (převzato z Pohlmann P.R. et al, 2009)

**A.** Navázání ligandu na receptory HER-1 (EGFR), HER-3 a HER-4 vede ke změně konformace těchto proteinů, která umožní dimerizaci a fosforylaci intracelulární části receptoru. HER-2 může vytvářet homodimery nebo heterodimery se členy rodiny HER.

**B.** Dimerizace HER-2 receptorů vede k aktivaci kaskády fosfatidylinositol-3-kinázy [PI3K] fosforylující fosfatidylinositol-(4,5)-difosfát (PIP2) na fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát (PIP3), který aktivuje fosfatidyl-inositol-dependentní kinázu 1 [PDK1], fosforylující PKB/AKT s významnými účinky jako je aktivace proliferačního potenciálu, inhibici apoptózy či změnám motility buněk.

**C.** Alternativní drahou signální transdukce po aktivaci HER2 receptoru je aktivace MAP kinázové kaskády – dimerizace HER-2 receptorů a fosforylace jejich intracelulárních domén slouží pro navázání adaptorových proteinů a aktivaci RAS proteinu (RAS-GDP), jež aktivuje RAF-1 kinázu zahajující kaskádu kinázových reakcí ovlivňujících fosforylaci transkripčního faktoru ERK, který reguluje transkripci genů ovlivňujících mitotickou, antiapoptotickou a angiogenní signalizaci.

Jaderný protein Ki67 má zásadní roli v buněčném cyklu, a to ve fázi mitózy. Zajišťuje elektrostatickou bariéru oddělující jednotlivé chromozomy při buněčném dělení (Gerdes J. et al, 1983; Kill, I.R. et al, 1996). Proliferační index nebo též mitotická aktivita odpovídá procentu pozitivních buněk, které jsou při použití imunohistochemického barvení na Ki67 pozitivní. Vysoká mitotická aktivita nádoru je indikátorem nepříznivého biologického chování (Pierga J.Y. et al., 1996; Liu S. et al, 2001; Viale G. et al, 2008).

#### **1.2.1.4 Klasifikace podle profilů genové exprese**

Na základě analýzy expresních profilů bylo v roce 2001 vytvořeno 5 kategorií karcinomu prsu s rozdílnou prognózou: luminal A, luminal B, basal-like, HER-2 a nezařaditelný (Perou C.M. et al, 2000). Výsledky této práce byly následně potvrzeny 2 nezávislými kohortami pacientů prezentovanými Westem M. et al, 2001 a van't Veer L.J. et al, 2002.

Vzhledem k finanční náročnosti a obtížnému získávání dostatečně kvalitního materiálu pro analýzy byly na konferenci v St. Gallen ustanoveny náhradní definice těchto molekulárních subtypů (Gnant M. et al, 2011). Tato definice byla následně ještě modifikována o informaci o progesteronových receptorech ([tabulka 1](#)) (Goldhirsch A. et al, 2013).

**Tabulka 1: Náhradní definice molekulárních subtypů.**

Subtyp	St. Gallen 2011 <sup>28</sup>	St. Gallen 2013 <sup>29</sup>
Luminal A	ER a PR pozitivní Ki67 <14 % HER-2 negativní	ER pozitivní a současně PR pozitivní ≥ 20% Ki67 <14 % HER-2 negativní
Luminal B	ER a PR pozitivní Ki67 ≥14 % a/nebo HER-2 pozitivní	ER pozitivní, HER-2 negativní Ki67 ≥14 % a/nebo PR pozitivní <20 % NEBO ER pozitivní, HER-2 pozitivní
Basal-like	ER a PR negativní HER-2 negativní	ER a PR negativní HER-2 negativní
HER-2	ER a PR negativní HER-2 pozitivní	ER a PR negativní HER-2 pozitivní

Správné určení charakteristik karcinomu prsu je nutné nejen pro správné stanovení typu nádoru, ale také pro volbu intenzity terapie. Zároveň je nutné mít na paměti heterogenitu nádorové tkáně, kde oblast prováděného vyšetření nemusí nutně odpovídat většinovému zastoupení

buněk v nádorové tkáni. Molekulární klasifikace se z tohoto pohledu jeví jako velmi účinný pomocník při rozhodování o volbě léčebné strategie.

### **1.2.2 Kolorektální karcinom (C18-20)**

Na rozdíl od karcinomu prsu představuje kolorektální karcinom histopatologicky zdánlivě uniformní onemocnění. Nicméně podobně jako u karcinomu prsu jej lze s pomocí expresních profilů rozdělit toto onemocnění do skupin, které se značně liší lokalizací a odpovědí na léčbu, a tím i prognózou.

#### ***1.2.2.1 Invazivní karcinomy***

Přibližně 98 % kolorektálních karcinomů tvoří adenokarcinomy (z toho 10-20 % mucinózní) (Leopoldo S. et al, 2008), velmi vzácně se jedná o neuroendokrinní tumory, dlaždicobuněčné karcinomy nebo jiné velmi raritní histologické diagnózy. V době diagnózy je synchronní postižení jiné části tlustého střeva diagnostikováno u přibližně 5 % pacientů (Bos A. et al, 2018).

#### ***1.2.2.2 Molekulární testování***

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je povrchový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou, který po navázání příslušného ligandu vede ke stimulaci růstu buněk a útlumu apoptózy. Nejvýznamnější signální kaskádou aktivovanou tímto receptorem je MAP kinázová dráha s aktivací proteinů rodiny RAS (K, N- a H-RAS) a následnou aktivací B-RAF kinázy (Kassouf E. et al, 2016). Aktivační mutace v těchto protoonkogenech vede k autonomní stimulaci signální dráhy nezávislé na povrchovém receptoru, čímž dochází ke stimulaci buněk k množení, přežívání a dediferenciaci spojené s metastazováním (Douillard J.Y. et al, 2013). Mutace v genu *K-RAS* (kodony 12 a 13) jsou identifikovány u 42,4 % pacientů, ostatní RAS mutace u 6,9 % pacientů a *B-RAF* mutace u 8,8 % pacientů s kolorektálním karcinomem (Vaughn C.P. et al, 2011).

Zatímco u pacientů s lokalizovanými CRC nebyl prokázán prognostický význam mutací v genu *K-RAS* (Roth A.D. et al, 2010), u pacientů s generalizovaným CRC jsou mutace v exonu 2 spojeny s horší prognózou a zároveň se jedná o prediktivní markery pro odpověď na anti-EGFR

terapii (Therkildsen C. et al, 2014). Na základě výsledků retrospektivní analýzy kohorty pacientů ze studie PRIME s rozšířeným testováním *K-RAS* a *N-RAS* mutací bylo doporučení na prediktivní testování u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem *K-RAS* rozšířeno o exony 3 a 4 a nově i *N-RAS* exony 2, 3 a 4 (Douillard J.Y. et al, 2013). Postupně byla retrospektivně analyzována data všech velkých studií s cílenou terapií a podobnými výsledky.

Aktivační mutace genu *BRAF* se vyskytují u méně než 10 % sporadických CRC, nejčastěji se jedná o mutaci V600 (vedoucí v kodonu 600 k záměně valinu za jinou aminokyselinu) a představuje velmi negativní prognostický faktor jak v časných stádiích, tak u metastazujících CRC (Roth A.D. et al, 2010; Yokota T. et al, 2011; Sinicrope F.A. et al, 2013; Modest D.P. et al, 2016). Významně méně informací máme o efektu mutací mimo kodon 600. V souboru více než 9600 pacientů bylo identifikováno 2,2 % pacientů s mutací *BRAF* mimo kodon 600 (pětina všech pacientů s mutací v genu *BRAF*). Tyto mutace se vyskytovaly častěji u mladších pacientů, u pravostranných tumorů a méně diferencovaných tumorů. Pacienti s mutací *BRAF* mimo kodon 600 dosáhli lepšího mediánu celkového přežití (Jones J.C. et al, 2017).

Důležitým prognostickým, ale i prediktivním ukazatelem kolorektálního karcinomu je mikrosatelitová instabilita (Jones J.C. et al, 2017), která je korelátem vrozených nebo získaných poruch oprav chybného párování bází v DNA (mismatch repair; MMR). Při funkčním defektu proteinů angažovaných v MMR systému dochází ke zhoršenému průběhu reparací jedno- nebo oligonukleotidových inzercí/delecí, které se ve zvýšené míře nacházejí v homopolymerních nebo mikrosatelitových oblastech. Mikrosatelitová nestabilita se nachází v 15-20 % sporadických karcinomů střeva (Shibata D. et al, 1994). V případě tumoru s deficitem MMR (somatickou, včetně metylace promotoru MLH1, nebo hereditární) je typický výskyt velkého počtu replikačních chyb. Mikrosatelitová instabilita je definována jako nestabilita  $\geq 30$  % mikrosatelitových oblastí (Thibodeau S.N. et al, 1993). U pacientů s lokalizovaným tumorem bez vzdálených metastáz je MSI dobrým prognostickým faktorem a je spojena s delším přežitím (Gryfe R. et al, 2000; Watanabe T. et al, 2001; Lanza G. et al, 2006; Zaanan A. et al, 2018). Prognostický význam MSI u metastatického CRC je nejasný, prevalence MSI je 3,5 % (tedy významně méně než u lokalizovaných stádií) (Smith C.G. et al, 2013). MSI je u těchto pacientů často spojeno se současnou mutací *BRAF* a tím i s horší prognózou těchto pacientů (Vanderbowch S. et al, 2014). Na druhou stranu je prokázána dobrá odpověď pacientů s mikrosatelitovou instabilitou na podávání anti-PD-1 protilátek, které významně prodlužují přežívání těchto pacientů (Lipson E.J., 2013; Lee V., Le D.T., 2016). Mikrosatelitová instabilita by měla být vyšetřována u všech pacientů s kolorektálním karcinomem.

Amplifikace genu HER-2 byla nalezena přibližně u 3-5 % pacientů s kolorektálním karcinomem a až u 15-35 % pacientů resistantních na anti-EGFR terapii. Současně bylo prokázáno horší přežívání těchto pacientů, přestože nebyla nalezena mutace v genu KRAS (Perkins G. et al, 2014).

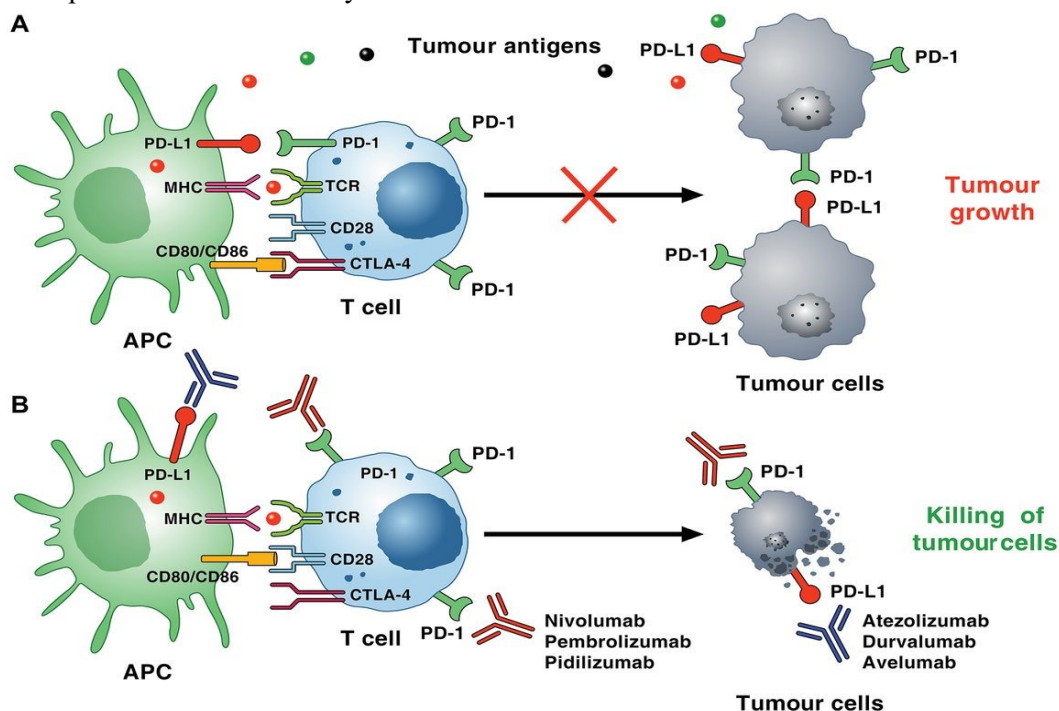
Epigenetické alterace mohou vést ke snížení nebo úplné ztrátě exprese různých genů. Za fenotyp spojený s metylací CpG oblastí (CIMP) považujeme tumory s vysokou frekvencí metylace promotorových sekvencí, což vede k ztrátě exprese, typicky například MLH1. Počet testovaných genů se pohybuje mezi 5-8 a spektrum je v různých studiích odlišné (Bae J.M. et al, 2013; Weisenberger D.J., 2015; Rhee Y.Y. et al, 2017). Přítomnost hypermetylace je hodnocena jako špatný prognostický faktor a častěji se vyskytuje v pravé části kolon.

### ***1.2.2.3 Tumor infiltrující lymfocyty***

V posledních letech se postupně hromadí data o důležitosti mikroprostředí nádoru a přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů při progresi či recidivě onemocnění. Zásadním pokrokem je ovlivnění této interakce pomocí modulátorů imunitních „kontrolních bodů“ (check-points). Hlavní mechanismus spočívá v zastavení útlumu imunitní reakce v nádorovém mikroprostředí zprostředkované buňkami tumoru exprimujícími na svém povrchu PD-L1 protein ([Obrázek 5](#)). V případě kolorektálního karcinomu je v kvantifikaci tumor infiltrujících lymfocytů nejdále Immunoscore, které bylo validováno na velkých souborech pacientů a potvrdilo svůj význam jako důležitý prognostický marker. Immunoscore je založeno na kvantifikaci CD8+ (cytotoxických) a CD3+ T-lymfocytů v centrální části tumoru a v invazivním okraji nádoru. Na základě těchto parametrů stratifikuje Immunoscore pacienty do 5 skupin (I0 – pacienti s velmi nízkou, až I4 pacienti s velmi vysokou hustotou sledovaných buněk). Pacienti s vysokým Immunoscore vykazovali výrazně delší přežívání, vyšší expresi PD-1 a PD-L1 a snížený sklon k metastazování oproti pacientům s nízkým Immunoscore, a to nezávisle na mikrosatelitové stabilitě (Mlecnik B. et al, 2016).

Ve studii s více než 800 pacienty rozdělenými dle přítomnosti, resp. nepřítomnosti vzdálených metastáz do dvou skupin nebyl zaznamenán rozdíl mezi mutacemi v RAS, BRAF nebo mikrosatelitové instabilitě. Následná analýza tumor infiltrujících lymfocytů ukázala významně zvýšený podíl I0 u pacientů se vzdálenými metastázami. Zároveň bylo nízké Immunoscore spojeno s kratším celkovým přežitím ve srovnání s I4 a to i v případě metastatického kolorektálního karcinomu. (Mlecnik B. et al, 2016)

**Obrázek 5: Mechanismus PD-1/PD-L1 indukované imunosuprese v nádorovém mikrostředí.** (převzato z Varricchi G. et al, 2017) **A.** Nádorové antigeny uvolňované nádorovými buňkami jsou zachyceny antigen prezentujícími buňkami (APC), které je následně vystavují na povrchu za pomoci MHC glykoproteinů. PD-L1 slouží k regulaci imunitní reakce, kdy jeho vazba na PD-1 receptor T-lymfocytů vede k útlumu. PD-L1 mohou na svém povrchu exprimovat také nádorové buňky. **B.** Blokádou PD-L1 nebo PD-1 bráníme útlumu aktivity T-lymfocytů, což má za následek opětovné ničení nádorových buněk.



Koncept kvantitativní infiltrace lymfocytů existuje již řadu let, nicméně až využití softwarové kvantifikace buněk infiltrujících nádor a současně velká mezinárodní multicentrická studie přiblížily Immunoscore k využití v rutinní klinické praxi (Galon J. et al, 2014).

### 1.3 Hereditární nádorové syndromy

Vznik nádorového onemocnění je komplexní, multifaktoriální proces vedoucí ke kumulaci různě významných mutací v onkogenech, tumor supresorových genech, DNA reparačních genech a genech proteinů účastnících se buněčné signalizace v somatické buňce. V důsledku těchto změn dojde k narušení regulace proliferace, diferenciace, apoptózy a signálních drah v buňce, které se projeví její nádorovou transformací. (Hanahan D., Weinberg R.A., 2000) Vznik somatických mutací genomové DNA v jednotlivých buňkách je běžným jevem, jehož frekvence se zvyšuje v důsledku expozice mutagenních faktorů. K jejich reparaci slouží DNA reparační mechanismy opravující různé druhy poškození DNA. V průběhu stárnutí organismu

dochází ke zvýšené pravděpodobnosti, že některé ze vzniklých alterací DNA zůstanou neopraveny.

Zhoubné nádory se většinou vyskytují ve vyšším věku, v rodinách ojediněle (sporadicky) a event. se mohou určité typy nádorů v rodinách opakovat v důsledku expozice stejným rizikovým faktorům životního stylu. Hereditární nádorové syndromy představují skupinu nádorových onemocnění, u kterých lze pozorovat jasný podíl dědičnosti na jejich vzniku. Tato skupina představuje přibližně 5 % všech nádorových onemocnění, ale u některých nádorových diagnóz může být podíl hereditární formy onemocnění výrazně vyšší (až 30 % u karcinomů ovaria).

Riziko vzniku nádorového onemocnění u nosiče mutace v nádorovém predispozičním genu je zřídka absolutní. Pravděpodobnost, s jakou ke vzniku onemocnění u nosičů mutací dochází, označujeme jako penetranci. Úplnou penetrancí se vyznačují mutace v genu *APC* při vzniku karcinomu tlustého střeva u pacientů s dědičným výskytem familiární adenomatózní polypózy. Jako mutace v genech spojené s vysokou penetrancí se označují varianty, které pro nosiče mutací znamenají více než pětinasobné zvýšení pravděpodobnosti vzniku onemocnění v porovnání s nenosičem. Středně penetrantní varianty jsou spojeny se dvou až pětinasobným zvýšením rizika.

### 1.3.1 Studium podstaty hereditárních nádorových onemocnění

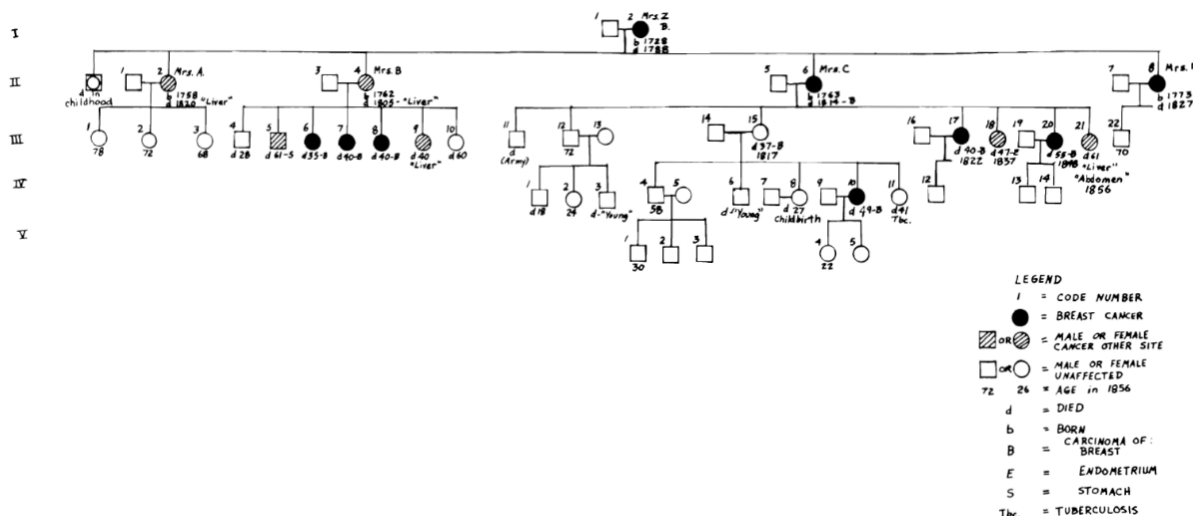
První zmínka o dědičné predispozici ke vzniku nádorových onemocnění pochází od Pierra Paula Brocy. Broca zdokumentoval rozsáhlý rodokmen rodiny postižené mnohočetným výskytem nádorů, především karcinomu prsu, v knize *Traite des Tumeurs* pocházející z roku 1866 ([Obrázek 6](#)). (Broca P.P., 1866)

V roce 1914 publikoval Theodor Boveri knihu *Zur Frage der Entstehung maligner Tumouren*, ve které jako hlavní spouštěč vzniku tumoru popsal jako ztrátu určitých klíčových buněčných znaků, přičemž důležitou roli podle něj hraje dědičnost.

Následně Alfred G. Knudson publikoval v roce 1971 hypotézu „dvou zásahů“, vycházející z nutnosti inaktivovat obě alely tumor supresorového genu. Prvním „zásahem“ je dědičná alterace jedné alely, která se fenotypově neprojeví, a druhým „zásahem“ je vznik mutace druhé/zbývající alely v průběhu života, což vede k rozvoji nádorové transformace. Tato hypotéza vychází z analýzy 48 pacientů s retinoblastomem. Na základě těchto dat byl roku 1987 objeven predispoziční gen *RBI*. (Knudson A.G., 1971)



**Obrázek 6: Rodokmen pacientky publikovaný Brocou roce 1866.** Rodokmen popisuje 26 členů rodiny, kteří přesáhli 30 let. U 15 z nich se vyvinulo tumor – z toho u 9 karcinom prsu (ženy) a 6 jedincům byl diagnostikován jiný karcinom. Převzato z Krush A.J. et al, 1979.



Klíčovým technologickým příspěvkem ve zkoumání dědičnosti byl rok 1977, kdy byl popsán princip tzv. Sangerova sekvenování, využívajícího 2',3'-dideoxyribonukleotidů (ddNTPs) terminujících polymeraci templátu DNA vytvářeného DNA polymerázou *in vitro* s následnou elektroforézou sekvenačních fragmentů na akrylamidovém gelu. (Sanger F. et al, 1977) V následujících letech došlo ke změně radioaktivního značení na fluorescenční a elektroforéza na akrylamidovém gelu byla nahrazena kapilární elektroforézou s automatickou detekcí nukleotidů.

V současné době je k analýzám využíváno masivní paralelní sekvenování nebo též sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS). Tato metoda umožňuje paralelní analýzu milionů DNA templátů v jediné analýze složené z více vzorků pacientů současně. Vysoký výkon NGS umožňuje provést sekvenci celého lidského genomu nebo exomu, přesto je při diagnostickém sekvenování prediktivních či prognostických parametrů konkrétního onemocnění využíváno panelů obsahujících vybrané geny. Důvodem je snaha snížit náklady, snížení nároků na bioinformatické zpracování a omezení diagnostických rozpaků vyplývajících ze zjištění velkého množství variant nejasného klinického významu (VUS). Bez ohledu na užívané platformy probíhá sekvenování nové generace ve třech technologických fázích, které zahrnují přípravu templátu a sekvenační knihovny, vlastní NGS analýzu a bioinformatické zpracování a analýzu dat. Příprava knihovny spočívá ve fragmentaci genomové DNA, navázání specifických adaptorů pro individuální identifikaci templátu (tzv. barkódy) a jeho amplifikaci pomocí PCR. Následuje sekvenování, kdy dle užívané technologie rozlišujeme sekvenování



syntézou (Illumina, Ion Torrent) nebo dnes již téměř opuštěné ligační sekvenování (SOLiD). Výsledkem NGS analýzy je velké množství získaných genotypových dat (Gb – Tb genetické informace). Tato data je nezbytné přiřadit k jednotlivým úsekům v genomu (mapování) a identifikovat v nich odchylky od referenční sekvence (variant calling). Funkční význam zachycených variant je nezbytné popsat (funkční anotace) před konečnou interpretací, kterou provádí genetik ve spolupráci se specialisty z jednotlivých oborů. (Morganti S. et al, 2019)

### 1.3.2 Nejčastější hereditární nádorové syndromy

Nádorových predispozičních genů bylo doposud popsáno několik set. Největší rozmach identifikace nových predispozičních genů byl zaznamenán v posledním desetiletí 20. století, kdy byly jako jedny z prvních popsány mutace v genech pro vznik hereditární formy karcinomu prsu a ovaria *BRCA1* (Miki Y. et al, 1994) a *BRCA2* (Wooster R. et al, 1995).

#### 1.3.2.1 Hereditární karcinom prsu

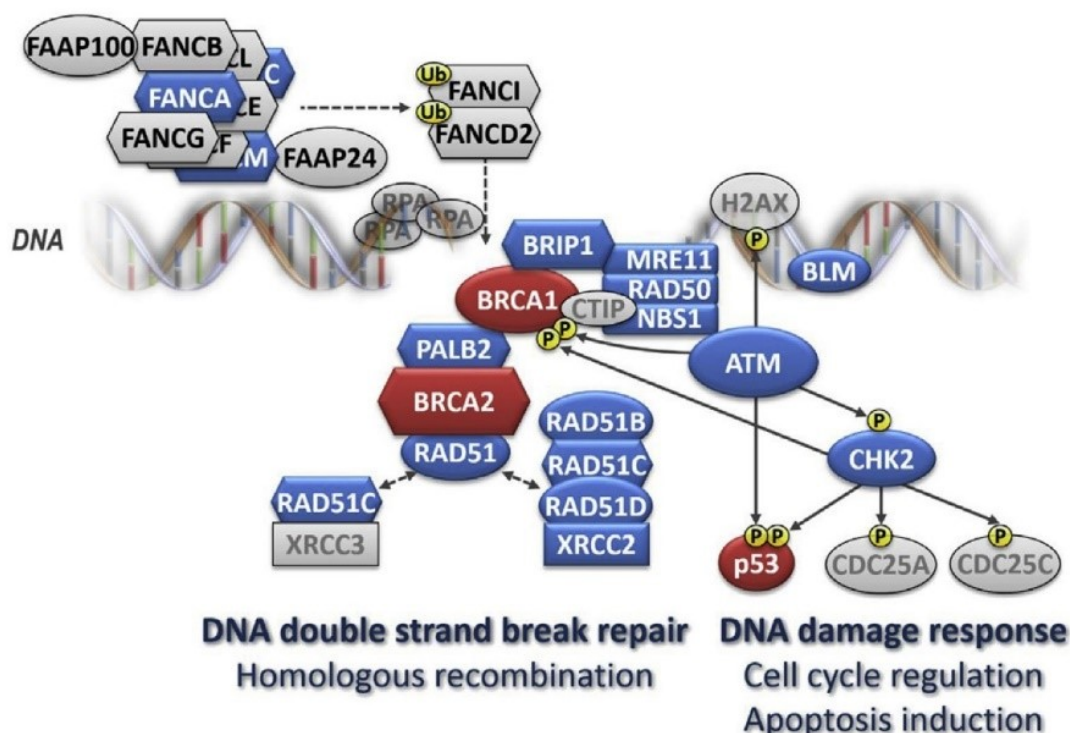
U přibližně 5-10 % karcinomů prsu lze prokázat hereditární dispozici (Begg C.B. et al, 2008; Kwon J.S. et al, 2010). Asi 80 % případů s hereditární dispozicí k nádorům prsu nebo ovaria je způsobeno zárodečnou mutací v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* (Szabo C.I. et al, 1997; Pohlreich P. et al, 2005). Proteiny BRCA1 i BRCA2 jsou velké jaderné fosfoproteiny, jejichž dominantní funkcí je podíl na opravách dvouřetězcových zlomů cestou homologní rekombinace. Na tomto procesu se oba proteiny účastní v podobě multiproteinových komplexů s dalšími proteiny, kódovaných geny, jejichž germinální mutace se rovněž podílejí na zvýšeném riziku vzniku karcinomu prsu ([Obrázek 7](#)) (Nielsen F.C. et al, 2016).

Celoživotní kumulativní riziko pro vznik nádoru prsu je u nosiček *BRCA1* mutace zvýšeno na 65-85 %, pro vznik nádoru vaječníku 39-65 %. U genu *BRCA2* je uváděno kumulativní riziko vzniku nádoru prsu 45-85 % a nádoru vaječníku 11-27 % (King M.C. et al, 2003; Kuchenbaecker K.B. et al, 2017). Nosiči mutací v BRCA genech mohou být také muži, nicméně riziko vzniku karcinomu prsu u těchto mužů je nižší než u žen. Mutace u obou pohlaví zvyšují riziko vzniku i dalších nádorů, zejména karcinomů tlustého střeva, žaludku, pankreatu, melanomů (u *BRCA2* nosičů), u mužů zvyšují riziko nádoru prostaty (Foulkes W.D. et al, 2008). Dalšími geny spojenými s předpokládaným vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu (celoživotní riziko >20 %) jsou: *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11* a *TP53*. Za geny středního kumulativního rizika karcinomu prsu (celoživotní riziko je 10-20 %) jsou

považovány geny *BARD1*, *BLM*, *BRIP1*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *EPCAM*, *MUTYH*, *NBN*, *RAD51C*, *RAD51D* a *WRN* (10-20 %). (Foretová L. et al, 2019)

**Obrázek 7:** Schematické znázornění zapojení produktů genů spojených s dědičným karcinomem prsu do oprav DNA a reakcí na poškození DNA. (převzato z Kleibl Z., Kristensen V.N., 2016)

Homologní rekombinace (HR) je nejpřesnější DNA reparační dráha, jejímž úkolem je oprava dvouřetězcových zlomů DNA v průběhu S a G2 fáze buněčného cyklu. Jako templát pro tento mnohastupňový proces slouží sesterská chromatida. Na počátku se na konce poškozené DNA naváží senzorické proteiny MRN komplexu (MRE11, RAD50 a NBN), následně začne s pomocí BLM helikázy odstraňování jednoho vlákna DNA za současného vzniku přesahujícího druhého vlákna. MRN komplex také přispívá k aktivaci ATM kinázy, která fosforyluje proteiny (včetně CHK2 nebo p53) zapojené do oprav poškozené DNA a odpoví na přítomnost DNA poškození (zástava buněčného cyklu/aktivace apoptózy). V dalším kroku dojde k vytvoření velkého nukleoproteinového komplexu, jehož součástí jsou proteiny BRCA1, BRCA2 a další členové rodiny proteinů Fanconio anémie (FA). Zatímco BRCA1 usnadňuje řadu interakcí mezi proteiny v místě přerušení DNA, hlavní (core) komplex, skládající se z proteinů FANCA-C, EG, L, M a asociovaných proteinů FAAP, ubikvitinyluje FANCD2/FANCI komplex v reakci na poškození DNA. Po ubikvitinylaci se tyto proteiny přesunou do místa poškození DNA a aktivují ostatní členy rodiny FA proteinů, včetně BRIP1 (FANCI), PALB2 (FANCD1) a BRCA2 (FANCD2). Následně se rekombináza RAD51 s přispěním několika dalších proteinů (RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 a XRCC3) váže na jednořetězcové přesahy a podporuje hledání homologní sekvence na sesterské chromatidě.



Pozn. Proteiny kódované vysoce penetrantními geny predisponujícími ke karcinomu prsu jsou označeny červeně, proteiny kódované geny se střední penetrancí jsou označeny modře. Schéma nezohledňuje některé vysoce penetrantní geny asociované s vysokým rizikem karcinomu prsu (*PTEN*, *STK11* a *CDH1*), jejichž mutace jsou velmi vzácné a jejichž genové produkty se přímo neúčastní reparace DNA.

### 1.3.2.2 *Hereditární kolorektální karcinom*

Nejčastějšími dědičnými syndromy spojenými s karcinomem tlustého střeva jsou Lynchův syndrom (dědičný nepolypózní kolorektální karcinom; HNPCC) a familiární adenomatózní polypóza (FAP). Tyto dva syndromy se podílejí na vzniku karcinomu tlustého střeva pouze v 5 % případů, přesto představují 90-95 % zjištěných mutací u pacientů s dědičnou formou karcinomu tlustého střeva (Lynch H.T. et al, 1993; Bert R.W. et al. 1995).

Příčinou Lynchova syndromu jsou mutace v některém z genů proteinů účastnících se opravy chybného párování bází v DNA („mismatch repair“ geny, MMR), nejčastěji se jedná o mutaci genu *MLH1*, méně často pak *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, event. *PMS1* (Moreira L. et al, 2012). Karcinomy tlustého střeva vzniklé v rámci Lynchova syndromu se vyznačují časným výskytem. Až 70 % primárních tumorů se u pacientů s Lynchovým syndromem nachází před lienální flexurou (tedy v pravé části colon) a 10 % pacientů má synchronní tumor v jiné části střeva (Parry S. et al, 2011). Celoživotní riziko onemocnění kolorektálním karcinomem se blíží 80 %. Dalším typickým nádorovým onemocněním doprovázejícím Lynchův syndrom je karcinom endometria, který v průběhu života může postihnout až 60 % nosiček mutace (Jenkins M.A. et al, 2006). Méně často se pak vyskytují jiné karcinomy (ovaria, žaludku, tenkého střeva, hepatobiliárního systému, močových cest, prsu) a další.

Klasická forma familiární adenomatózní polypózy (FAP) je charakterizována výskytem více než 100 adenomatózních polypů tlustého střeva (nebo méně polypů v mladším věku) (Petersen G.M. et al, 1991). Podkladem tohoto syndromu je zárodečná mutace v genu *APC* (Burt R.W. et al, 1995). Zodpovídá pouze za vznik ~ 1 % karcinomů tlustého střeva. Mnohočetné polypy se objevují časně v distální oblasti tlustého střeva a v konečníku, současně se mohou vyskytovat i v tenkém střevu a v žaludku, kde jsou také spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu. Polypy se u nosičů mutací začínají objevovat kolem 16 roku života a kolorektální karcinom vzniká u téměř 100 % nemocných do 50 let věku (Bisgaard M.L. et al, 1994). Mutace v promotoru genu *APC* způsobují vzácný GAPPS (Gastric adenokarcinoma and proximal polyposis of the stomach) syndrom, který se manifestuje vznikem >100 polypů v oblasti fundu nebo antra žaludku, s vysokým rizikem malignizace do podoby adenokarcinomu v mladém věku (Worthley D.L. et al, 2012).

Vzácnější forma polypózy je spojena s přítomností dědičných mutací v obou alelách genu *MUTYH*. Typickým projevem *MUTYH*-asociované polypózy (MAP) je výskyt mnohočetných

polypů v tlustém střevě (Sieber O.M. et al, 2003; Sampson J.R. et al, 2003). Projevy mimo colon (polypy v žaludku nebo duodenu, osteomy, hypertrofie pigmentového epitelu retiny) jsou vzácné. Kromě karcinomu tlustého střeva je u nosičů bialelických mutací zvýšené riziko vzniku karcinomu močového měchýře, duodena a ovaria (Terdiman J.P., 2009).

Další vzácnou skupinou hereditárních nádorových onemocnění jsou hamartomatózní polypózní syndromy, jejichž výskyt je velmi vzácný. Jedná se o Peutz–Jeghers syndrom (*STK11*), juvenilní polypózu (*SMAD4/ BMPRIA*) a Cowdenův syndrom (*PTEN/ BMPRIA*).

### 1.3.3 Preventivní opatření

Vysoké riziko vzniku nádorových onemocnění u nosičů dědičných patogenních variant opravňuje indikaci preventivních opatření, včetně chirurgické prevence zaměřené na odstranění tkáně, ve které může s vysokou pravděpodobností dojít ke vzniku nádorového ložiska. Za vysoké riziko se obvykle považuje výskyt závažného nádorového onemocnění u nosiče mutace s celoživotním rizikem přesahujícím 20 %.

Základem preventivních opatření je včasná identifikace nosičů zárodečných mutací, která vyžaduje zcela nezpochybnitelnou identifikaci příčinné genetické alterace. Pokroky v diagnostice umožnily analýzu desítek až stovek genů v reálném čase a tím výrazně zrychlily diagnostické postupy. Plošný screening všech osob s onkologickými onemocněními či dokonce celé populace však z důvodu finančních nákladů (a nevyjasněných etických a právních hledisek) stále není možný, a proto je pro analýzu nádorové predispozice nutné stanovit indikační kritéria, sloužící pro identifikaci rizikové populace na základě fenotypových histopatologických a klinických charakteristik onkologického onemocnění u pacienta a výskytu a charakteru onkologických onemocnění u jeho příbuzných. Kritéria jsou nastavena tak, aby zachytnost nosičů mutací ze skupiny osob splňující dané kritérium dosáhla alespoň 10 %.

Indikační kritéria pro genetické testování nádorové predispozice procházejí v průběhu let značnými změnami, které zohledňují poznatky získané z teoretického a preklinického výzkumu, ale i z klinických studií rozsáhlých souborů analýz vysoce rizikových pacientů, pacientů s neselektovanými nádory a kontrolních osob bez nádorových onemocnění. (Foretová L. et al, 2016; Foretová L. et al, 2019) S přibývajícím počtem genů s prokázanou souvislostí s hereditárními nádorovými syndromy je nutné opakovaně provádět kontrolu indikačních kritérií tak, abychom měli jistotu, že nedochází k podhodnocení některé rizikové skupiny.

Zároveň je u každého genu nutné stanovit konkrétní rizika pro určitý typ nádorového onemocnění a na základě toho nabídnout pacientovi přiměřenou, riziku odpovídající prevenci. Přes významné pokroky v onkogenetice v posledních letech jsou však rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorových onemocnění vyčíslena pouze pro nosiče mutací v hlavních predispozičních genech. U vzácných nebo populačně specifických alterací středně penetrantních genů může být určení rizika pro konkrétní nádorové onemocnění velmi obtížné, protože pro jeho vyčíslení je potřeba shromáždit reprezentativní skupinu nosičů mutací, kterou lze však vybrat pouze z rozsáhlých kohort analyzovaných pacientů (řádově tisíce až desetitisíce vyšetřených osob). V těchto případech je důležitá mezinárodní spolupráce a vytvoření registrů nosičů mutací těchto vzácných genů s podrobnými informacemi o výskytu nádorových onemocnění tak, aby bylo možné stavět míru rizika a tomu přizpůsobit rozsah preventivních opatření.

U nosičů mutací ve vysoce penetrantních nádorových predispozičních genech lze indikovat (Tabulka 2):

- a) Primární preventivní opatření – cílem je zabránit vzniku nádorového onemocnění, jedná se o preventivní chirurgii, kdy odstranění konkrétního orgánu vede k výrazné redukci celoživotního rizika;
- b) Sekundární preventivní opatření – cílem je zachyt onemocnění v co nejčasnějším stádiu, k tomu slouží individuální screeningové programy pro nosiče patogenních mutací. Jako příklad je možné uvést preventivní opatření pro nosiče mutací v genech *BRCA1/BRCA2* uvedené v tabulce 2.
- c) Prediktivní testování příbuzných nosiče mutace.

**Tabulka 2:** Doporučená preventivní opatření u nosičů patogenních mutací *BRCA1* a *BRCA2*.  
(modifikováno z Petráková K. et al, 2019; Zikán M., 2019)

<p><b>primární prevence</b> (preventivní výkony, pokles rizika na 1-5 %)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ bilaterální profylaktická mastektomie od 25 let (možno kombinovat s okamžitou rekonstrukcí)</li> <li>▪ bilaterální salpingo-ooforektomie (u <i>BRCA1</i> nosiček do 40 a u <i>BRCA2</i> nosiček do 45 let)</li> </ul>
<p><b>sekundární prevence</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>žena</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ fyzikální vyšetření á 6 měsíců</li> <li>▪ zobrazovací vyšetření prsou á 6 měsíců od 25 let (nebo o 10 let dříve než vyskyt v rodině) <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ střídavě MRI a USG vyšetření do 65 let</li> <li>▪ MMG ve 30 letech a následně á 2 roky</li> </ul> </li> <li>▪ gynekologické vyšetření á 6 měsíců od 25 let + odběry CA125 (po provedení preventivních výkonů kontrolní vyšetření prsou á 2 roky + gynekologické vyšetření á 1 rok)</li> <li>▪ kolonoskopie á 3-5 let od 45 let + test okultního krvácení á 1 rok</li> <li>▪ gastroskopie ve 45 letech (u <i>BRCA2</i> nosičů)</li> <li>▪ oční a kožní vyšetření á 12 měsíců (u <i>BRCA2</i> nosičů)</li> </ul> </li> <li>▪ <u>muž</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ klinické vyšetření prsou od 35 á 1 rok, MMG nebo USG při suspekci</li> <li>▪ odběry PSA od 40 let á 1 rok</li> <li>▪ kolonoskopie á 3-5 let od 45 let + test okultního krvácení á 1 rok</li> <li>▪ gastroskopie ve 45 letech (u <i>BRCA2</i> nosičů)</li> <li>▪ oční a kožní vyšetření á 12 měsíců (u <i>BRCA2</i> nosičů)</li> <li>▪ <i>možno zvážit endosonografické vyšetření pankreatu á 12 měsíců</i></li> </ul> </li> </ul>

## 2 VÝCHODISKA A CÍLE PRÁCE

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN se dlouhodobě věnuje studiu prognostických a prediktivních faktorů využitelných při rozhodování o léčbě onkologických pacientů. V popředí našeho zájmu jsou nejčastější nádorová onemocnění v ČR včetně karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu.

U pacientek s karcinomem prsu se ve spolupráci s Ústavem biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK dlouhodobě zabýváme skupinou žen s dědičnou formou onemocnění. Od roku 1997 se podařilo shromáždit unikátní kolekci pacientek indikovaných ke genetickému testování. Analýzy probíhaly zpočátku kaskádovým testováním jednotlivých nádorových predispozičních genů podle předpokládané prevalence jejich alterací v naší populaci. Po provedení analýz v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2* se však stále více ukazovalo, že další analýzy pouze jednotlivých genů jsou s ohledem na raritní zachyt mutací ekonomicky a časově nerentabilní. Uvedení masivního paralelního sekvenování nové generace na konci první dekády milénia však skýtalo nové možnosti pro diagnostiku širokého spektra predispozičních genů u prospektivně testovaných osob i pacientek retrospektivního souboru. Největší část souboru tvoří mladé pacientky, jejichž léčba a sledování je jedním z hlavních předmětů zájmu Onkologické kliniky.

Spojení informací získaných z molekulárních analýz s klinicko-patologickými charakteristikami dlouhodobě sledovaných pacientek s karcinomem prsu umožňuje srovnání těchto charakteristik u nosiček a nenosiček mutací a umožňuje vyhodnocení prognostického významu jednotlivých charakteristik u obou skupin.

Dalším z klíčových výzkumných programů Onkologické kliniky je identifikace nových diagnostických, prognostických a prediktivních nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem. Cílem této snahy je zlepšení stratifikace rizika progresu a rekurence u pacientů s kolorektálními nádory a individualizace protinádorové léčby. V rámci dlouhodobé spolupráce s Ústavem lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN je objektem našeho společného zájmu identifikace faktorů produkovaných nádorovými buňkami a buňkami nádorového mikroprostředí (proteinové nádorové markery, analýza plazmy cestou Ramanovy spektroskopie, kvantitativní a kvalitativní analýzy cirkulujících imunitních

buněk). Ve spolupráci s Pathologisches Institut Universitätsklinikum v Erlangenu se v rámci mezinárodního konsorcia Immunoscore zabýváme studiem interakcí mezi nádorovými buňkami a buňkami imunitního systému, což by umožnilo zlepšení vyhodnocení morfologických a molekulárních charakteristiky nádorových ložisek.

### **Cíle dizertační práce:**

**Předkládaná práce se zabývá problematikou významu stávajících a identifikací nových prediktivních a prognostických znaků umožňujících zlepšení léčby u vysoce rizikových osob s karcinomem prsu nebo kolorekta. Konkrétně se potom soustředí na:**

Identifikaci nových postupů klinické diagnostiky dědičných nádorových syndromů, založených na sekvenování nové generace s cílem charakterizace skupin vysoce rizikových pacientek s karcinomem prsu:

- 1) s mutacemi v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*,
- 2) s mutacemi v dalších predispozičních genech,
- 3) a pacientek bez výskytu dědičných mutací,

které by umožnily vyhodnocení významu prognostických markerů karcinomu prsu v těchto skupinách.

Identifikace diagnostických a prognostických markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem, jež by umožnily:

- 1) stratifikovat prognózu u pacientů s metastatickým onemocněním na základě biochemických markerů v séru s cílem identifikovat nemocné vhodné pro radikální resekční výkony v oblasti jater, event. v kombinaci s resekcemi primárního tumoru. Současně identifikovat pacienty s velmi špatnou prognózou a malým benefitem z terapie, u kterých je užití kombinovaných terapeutických přístupů diskutabilní.
- 2) zlepšení odhadu rizika relapsu onemocnění na základě detailní imunohistopatologické analýzy primárního ložiska kolorektálního karcinomu zaměřené na kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů.



### 3 SEZNAM PRACÍ SLOUŽÍCÍCH JAKO PODKLAD DIZERTAČNÍ PRÁCE

#### V časopisech s IF (bez IF – **označeny**)

1. Lhota F, Zemankova P, Kleiblova P, Soukupova J, **Vocka M**, Stranecky V, Janatova M, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients. *Clin Genet*. 2016;90(4):324-33, (IF<sub>2016</sub>= 3.512).
2. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, Stolarova L, Lhota F, Foretova L, Machackova E, Stranecky V, Tavandzis S, Kleiblova P, **Vocka M**, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. Validation of CZE CANCA (Czech CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS – based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195761, (IF<sub>2018</sub>=2.766).
3. **Vocka M**, Zimovjanova M, Bielikova Z, Tesarova P, Petruzelka L, Mateju M, Krizova L, Kotlas J, Soukupova J, Janatova M, Zemankova P, Kleiblova P, Novotny J, Konopasek B, Chodacka M, Brychta M, Sochor M, Smejkalova-Musilova D, Cmejlova V, Kozevnikovova R, Miskarova L, Argalacsova S, Stolarova L, Lhotova K, Borecka M, Kleibl Z. Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in BRCA1/BRCA2 Mutation Carriers Versus Non-Carriers. *Cancers* (Basel). 2019;11(6), (IF<sub>2019</sub>=5.326).
4. Kleiblova P, Stolarova L, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, **Vocka M**, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenкова J, Schneiderova M, Burocziova M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavandzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2019; (IF<sub>2019</sub>=5.326).
5. **Vocka M**, Langer D, Petrtyl J, Vockova P, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer. *Neoplasma*. 2015;62<sup>13</sup>:470-7, (IF<sub>2015</sub>=1.961).

6. **Vocka M**, Langer D, Fryba V, Petrtyl J, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) as new potential serum marker in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2018;21(4):869-874, (IF<sub>2018</sub>=2.274).
7. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, **Vocka M**, Spacek J, Petruzelka L, Konopasek B, Dundr P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Muşină AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet.* 2018;391(10135):2128-2139, (IF<sub>2018</sub>=47.831).

#### Seznam dalších spoluautorských prací v časopisech s IF (bez IF – **označeny**)

8. Zavadova E, **Vocka M**, Petruzelka L, Konopasek B, Fucikova T, Petruzelka L. Cellular and humoral immunodeficiency in breast cancer patients resistant to hormone therapy. *Neoplasma.* 2014;61(1):90-8, (IF<sub>2014</sub>= 1.961).
9. **Vočka M**, Petruželka L. Zařazení režimu FOLFIRINOX do algoritmu léčby metastazujícího karcinomu slinivky břišní – první zkušenosti. *Gastroent Hepatol.* 2014; 68(5): 436–440.
10. Janatova M, Soukupova J, Stribrna J, Kleiblova P, **Vocka M**, Boudova P, Kleibl Z, Pohlreich P. Mutation Analysis of the RAD51C and RAD51D Genes in High-Risk Ovarian Cancer Patients and Families from the Czech Republic. *PLoS One.* 2015;10(6):e0127711 (IF<sub>2015</sub>=4.411).

11. Janatová M, Borecká M, Soukupová J, Kleiblová P, Stříbrná J, Vočka M, Zemánková P, Panczak A, Veselá K, Souček P, Foretová L, Kleibl Z. PALB2 as Another Candidate Gene for Genetic Testing in Patients with Hereditary Breast Cancer in Czech Republic. *Klin Onkol.* 2016; 29(Suppl 1):S31-4.
12. Borecka M, Zemankova P, **Vocka M**, Soucek P, Soukupova J, Kleiblova P, Sevcik J, Kleibl Z, Janatova M. Mutation analysis of the PALB2 gene in unselected pancreatic cancer patients in the Czech Republic. *Cancer Genet.* 2016; 209(5): 199-204, (IF2016=1,930).
13. Borecka M, Zemankova P, Lhota F, Soukupova J, Kleiblova P, **Vocka M**, Soucek P, Ticha I, Kleibl Z, Janatova M. The c.657del5 variant in NBN gene predisposes to pancreatic cancer. *Gene.* 2016;587(2):169-72, (IF2016=2.415).
14. Zemankova P, Lhota F, Kleiblova P, Soukupova J, **Vocka M**, Janatova M, Kleibl Z. RE: Frameshift variant FANCL\*c.1095\_1099dupATTA is not associated with high breast cancer risk. *Clin Genet.* 2016;90(4):387-9, (IF2016=3.326).
15. Hojny J, Zemankova P, Lhota F, Sevcik J, Stranecky V, Hartmannova H, Hodanova K, Mestak O, Pavlista D, Janatova M, Soukupova J, **Vocka M**, Kleibl Z, Kleiblova P. Multiplex PCR and NGS-based identification of mRNA splicing variants: Analysis of BRCA1 splicing pattern as a model. *Gene.* 2017; 30(637):41-49, (IF2017=2.498).
16. Janatová M, Borecká M, Soukupová J, Kleiblová P, Stříbrná J, Vočka M, Zemánková P, Panczak A, Veselá K, Souček P, Foretová L, Kleibl Z. PALB2 as Another Candidate Gene for Genetic Testing in Patients with Hereditary Breast Cancer in Czech Republic. *Klin Onkol.* 2016;29(Suppl 1):S31-4.
17. **Vočka M**, Petruželka L. Modifikovaný FOLFIRINOX v léčbě karcinomu pankreatu – účinnost a toxicita. *Gastroent Hepatol.* 2016; 70(5): 413–417.
18. Špaček M, Mitáš P, **Vočka M**, Lacina L, Hodková G, Špunda R, Kodet O, Krajsová I, Petruželka L, Trnka J, Kubinyi J, Matějovský Z, Lambert L, Lindner J. Izolovaná perfuze horní končetiny s TNF- $\alpha$  - Dvojitá kanylace žilního systému. *Klin Onkol.* 2017; 30(3): 213-219.
19. **Vočka M**, Petruželka L. The Inclusion of a Gemcitabine + Nab-paclitaxel Regimen as a 2nd Line Treatment for Advanced Pancreatic Cancer - First Experience. *Klin Onkol.* 2017; 30(6): 452-455.
20. Stanek L, Springer D, Konopasek B, **Vocka M**, Tesarova P, Syrucek M, Petruzelka L, Vicha A, Musil Z. Molecular pathological predictive diagnostics in a patient with non-

small cell lung cancer treated with crizotinib therapy: A case report. *Oncol Lett.* 2017; 14(6): 7545-7548, (IF<sub>2017</sub>=1.664).

21. Spacek J, **Vočka M**, Netikova I, Skalova H, Dundr P, Konopasek B, Zavadova E, Petruzelka L. Immunological examination of peripheral blood in patients with colorectal cancer compared to healthy controls. *Immunol Invest.* 2018; 20: 1-11, (IF<sub>2018</sub>=2.588).
22. Langer D, **Vočka M**, Kalvach J, Ryska M. Assessment of anastomosis perfusion by fluorescent angiography in robotic low rectal resection: the results of a non-randomized study. *Rozhl Chir.* 2019; 98(3): 110-114.
23. **Vočka M**, Špaček M, Matějovský Z, Trnka J, Hodková G, Skibová D, Zogala D, Lindner J, Petruželka L. Neoadjuvant Hypertermic Isolated Limb Perfusion in Treatment of Undifferentiated Spindle Cell Sarcoma of Lower Limb with Achieved Complete Pathologic Response. *Klin Onkol.* 2019; 32(3): 211-213.

## 4 KOMENTÁŘ K VYBRANÝM PUBLIKOVANÝM PRACÍM

### 4.1 Článek 1: Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in *BRCA1/BRCA2/PALB2*-negatively tested breast cancer patients.

Lhota F, Zemankova P, Kleiblova P, Soukupova J, Vocka M, Stranecky V, Janatova M, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. *Clin Genet.* 2016;90(4):324-33, (IF<sub>2016</sub>= 3.326).

Práce analyzuje předpoklady pro aplikaci panelového NGS v diagnostice dědičných alterací známých a kandidátních nádorových predispozičních genů. Pro analýzu bylo vybráno 325 vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu, u kterých byla vyloučena mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/BRCA2/PALB2* a 105 nenádorových kontrol. Analyzovaní pacienti byli vybráni na základě splnění indikačních kritérií pro analýzu nádorové predispozice. Kompletní klinická a histologická data od pacientů byla získána ze zdravotnické dokumentace. U vyšetřovaných osob byla provedena analýza 581 genů na platformě SOLiD. Soubor vyšetřovaných genů zahrnoval 141 genů kódujících proteiny účastníci se DNA reparačních procesů a 449 genů zmíněných v souvislosti se vznikem či prognózou karcinomu prsu v databázi PhenoPedia.

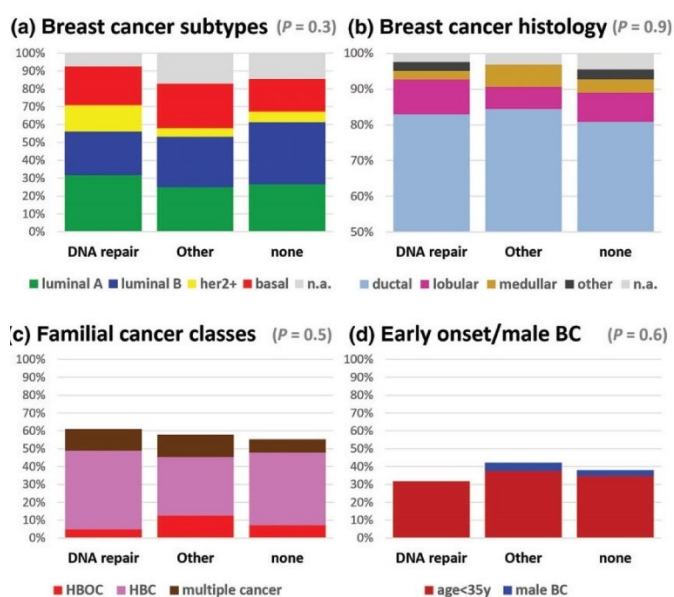
Největší pozornost byla věnována variantám zkracujícím proteinový produkt. V souboru pacientů s karcinomem prsu bylo identifikováno 127 různých trunkačních variant, které lze považovat za závažné alterace s významnou poruchou genových produktů. Varianty zkracující proteinový produkt jsme našli celkem u 32,3 % pacientů (u 19 pacientů byla přítomna více než jedna trunkační varianta).

Z hlediska výskytu jsme trunkační varianty rozdělili na varianty v genech kódujících DNA reparační proteiny a v ostatních genech. Celkem bylo identifikováno 36 trunkačních variant v 25 genech kódujících proteiny účastníci se reparačních pochodů DNA. Nejčastěji alterovanými byly geny kódující proteiny komplexu Fanconiho anemie.

V souboru genů neúčastnících se reparací DNA byly trunkační varianty identifikovány u 22,8 % pacientů a 9,5 % kontrol. Varianty v těchto genech jsme rozdělili do několika funkčních skupin. Mezi nejčastější patřily trunkační varianty postihující některý z genů kódujících proteiny účastníci se metabolismu a signalizace steroidních hormonů, které jsme

zachytili celkem u 15 (5 %) pacientek a 1 (1 %) kontroly. Do této skupiny patřily především geny pro cytochromy p450, které přispívají k biosyntéze estrogenů (CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1) nebo jeho katabolismu (CYP3A5, CYP1A2). Vzhledem k tomu, že estrogeny mohou ovlivnit etiologii karcinomu prsu, je nutné uvažovat o těchto variantách jako o potenciálních modifikátorech rizika vzniku karcinomu prsu.

V práci jsme rovněž popsali základní klinicko-patologické charakteristiky u nosičů mutací v DNA reparačních genech, ostatních genech a nenosičů dědičných mutací, které však nevykazovaly signifikantní rozdíly (Obrázek 7).



**Obrázek 7:** Klinicko-patologické charakteristiky 325 analyzovaných pacientek rozdělených dle přítomnosti trunkačních variant v jednotlivých skupinách genů.

**A** – zastoupení subtypů karcinomu prsu ( $p = 0,3$ ); **B** – zastoupení histologických typů ( $p = 0,9$ ); **C** – zastoupení tříd rodinné anamnézy ( $p = 0,5$ ); **D** – zastoupení časného výskytu nebo výskytu u mužů ( $p = 0,6$ )

Práce ukázala, že panelové sekvenování je vhodným přístupem k analýze hereditárních nádorových dispozic umožňujícím v relativně krátkém čase získat výsledky analýzy několika stovek genů s možnou spojitostí se vznikem nádorového onemocnění. Patogenní či pravděpodobně patogenní mutace jsme našli u téměř třetiny vyšetřovaných vysoce rizikových osob, přičemž u 30/325 nemocných (9 %) jsme tyto mutace našli v genech jasně asociovaných s dědičnými nádorovými syndromy. Na druhé straně velikost panelu cíleného na analýzu 581 genů ukázala, že u řady alterací nejsme schopni určit jejich možný význam s ohledem na nádorovou predispozici. Nedostatečná velikost vyšetřovaného souboru rovněž neumožnila identifikovat rozdíly v klinických charakteristikách u nosičů nalezených dědičných mutací.

## 4.2 Článek 2: Validation of CZEKANCA (Czech CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS – based analysis of hereditary cancer syndromes.

Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K, Janatova M, Borecka M, Stolarova L, Lhota F, Foretova L, Machackova E, Stranecky V, Tavandzis S, Kleiblova P, **Vocka M**, Hartmannova H, Hodanova K, Kmoch S, Kleibl Z. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195761, (IF<sub>2018</sub>=2.766).

V návaznosti na zkušenosti s analýzou s široce koncipovaným panelem 581 genů z předchozí práce byl připraven panel CZEKANCA v. 1.0, který zahrnoval 219 genů s prokázaným nebo předpokládaným zvýšením rizika vzniku dědičných nádorových onemocnění. Do panelu byly zařazeny geny 3 skupin: skupina A – geny s prokázanou (nezpochybnitelnou) asociací s nádorovou hereditou se známým a významně zvýšeným relativním rizikem pro nosiče ( $RR > 5$ ); skupina B – geny s prokázanou jasnou asociací s nádorovou hereditou (evidentní na základě několika publikovaných studií) a významně zvýšeným relativním rizikem pro nosiče ( $RR \geq 2$ –5) nebo v případě, že  $RR$  není stanoveno pro nedostatek studií/nosičů; a skupina C – geny s nejasnou, avšak předpokládanou asociací s nádorovými hereditami vycházející z ojedinělé studie nebo preklinických dat nebo geny, jejichž produkty jsou zapojeny v signální dráze, ve které poruchy v jiných genech (kódujících kooperující proteiny) prokazatelně souvisejí s nádorovou predispozicí. (Soukupová J. et al, 2016)

Pro geny skupiny A-B jsou k dispozici klinická doporučení pro sledování nebo preventivní výkony, zatímco u genů skupiny C taková doporučení k dispozici nejsou. V případě méně penetrantních genů, jejichž mutace navíc nejsou v populaci příliš časté, je stanovení  $RR$  velmi obtížným úkolem a vyžaduje vytvoření velkých souborů (v řádu desítek tisíc pacientů) v rámci národních nebo mezinárodních konsorcií.

Před zavedením sekvenčního panelu CZEKANCA do rutinní klinické diagnostiky hereditárních nádorových syndromů jsme provedli důkladné testování parametrů panelu. Testování bylo provedeno na souboru 389 vzorků dříve analyzovaných na přítomnost zárodečných mutací v predispozičních genech, z toho u 137 vzorků byla prokázána přítomnost patogenní jednonukleotidové varianty (single nucleotide variants, SNVs) nebo krátkých insercí a delecí v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *NBN*, *DPYD*, *PPM1D*, *RAD51C*,

*RAD51D* nebo *TP53*; a u 35 vzorků byla dříve prokázána rozsáhlejší přestavba v genech *BRCA1*, *PALB2*, *CHEK2* nebo *TP53*.

Testování ukázalo, že v rutinních podmínkách sekvenování cílicí na průměrné pokrytí 100x dosahuje sekvenování panelem CZEKANCA tohoto pokrytí v 85,8 % a pokrytí 50x v 98,4 % cílové oblasti. Pouze 0,3 % cílové oblasti je pokryto <20x. Dodatečná analýza ve 4 laboratořích prokázala vysokou mezilaboratorní uniformitu pokrytí a vysokou shodu při sekvenování kontrolních vzorků, která se pohybovala mezi 98,5 % – 99,7 % shodných variant. Rozdíly mezi jednotlivými laboratořemi lze částečně přisoudit odlišnému způsobu fragmentace genomové DNA a sekvenačním chybám, ke kterým jsou náchylné především analýzy homopolymerních oblastí.

Posledním důležitým krokem byla optimalizace CNV analýzy na více než 300 vzorcích souběžně analyzovaných pomocí MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), která prokázala 100% detekci intragenových přestaveb.

Kvalitativní parametry a výsledky interních kontrol kvality byly doplněny o nezávislé hodnocení European Molecular Genetics Quality Network ([www.emqn.org](http://www.emqn.org)) s dosažením 100% senzitivity při detekci variant a také analýzou referenčních vzorků z Coriell Institute for Medical Research s dosažením senzitivity více než 98,6 %.

Výše uvedené výsledky potvrdily funkčnost panelu CZEKANCA umožňující spolehlivou detekci nejen SNV a malých inzercí nebo delecí, ale také hodnocení rozsáhlejších přestaveb u většiny vyšetřovaných genů. Provedené analýzy také prokázaly uniformitu bioinformatického zpracování všech vzorků členů CZEKANCA konsorcia, které umožňuje sloučení mezilaboratorních výsledků pro vytvoření frekvenční databáze hereditárních variant predispozičních genů u vysoce rizikových osob v ČR.



### 4.3 Článek 3: Estrogen Receptor Status Oppositely Modifies Breast Cancer Prognosis in *BRCA1/BRCA2* Mutation Carriers Versus Non-Carriers.

**Vocka M**, Zimovjanova M, Bielicikova Z, Tesarova P, Petruzelka L, Mateju M, Krizova L, Kotlas J, Soukupova J, Janatova M, Zemankova P, Kleiblova P, Novotny J, Konopasek B, Chodacka M, Brychta M, Sochor M, Smejkalova-Musilova D, Cmejlova V, Kozevnikovova R, Miskarova L, Argalacsova S, Stolarova L, Lhotova K, Borecka M, Kleibl Z. *Cancers* (Basel). 2019;11(6), (IF<sub>2019</sub>=5.326).

Expres ER je důležitým prognostickým a prediktivním ukazatelem u pacientek se sporadickým karcinomem prsu, avšak význam tohoto faktoru u nosiček mutací v genu *BRCA1* a *BRCA2* nebyl dokumentován, přestože karcinomy prsu se z hlediska exprese estrogenních receptorů u nosiček mutací významně odlišují. Řada publikací v minulosti dokumentovala prognostický význam přítomnosti mutací genu *BRCA1* a *BRCA2* u pacientek s karcinomem prsu protichůdně. Naprosté minimum publikací zkoumalo význam klinicko-patologických charakteristik u nosiček mutací s karcinomem prsu v porovnání s pacientkami bez mutací.

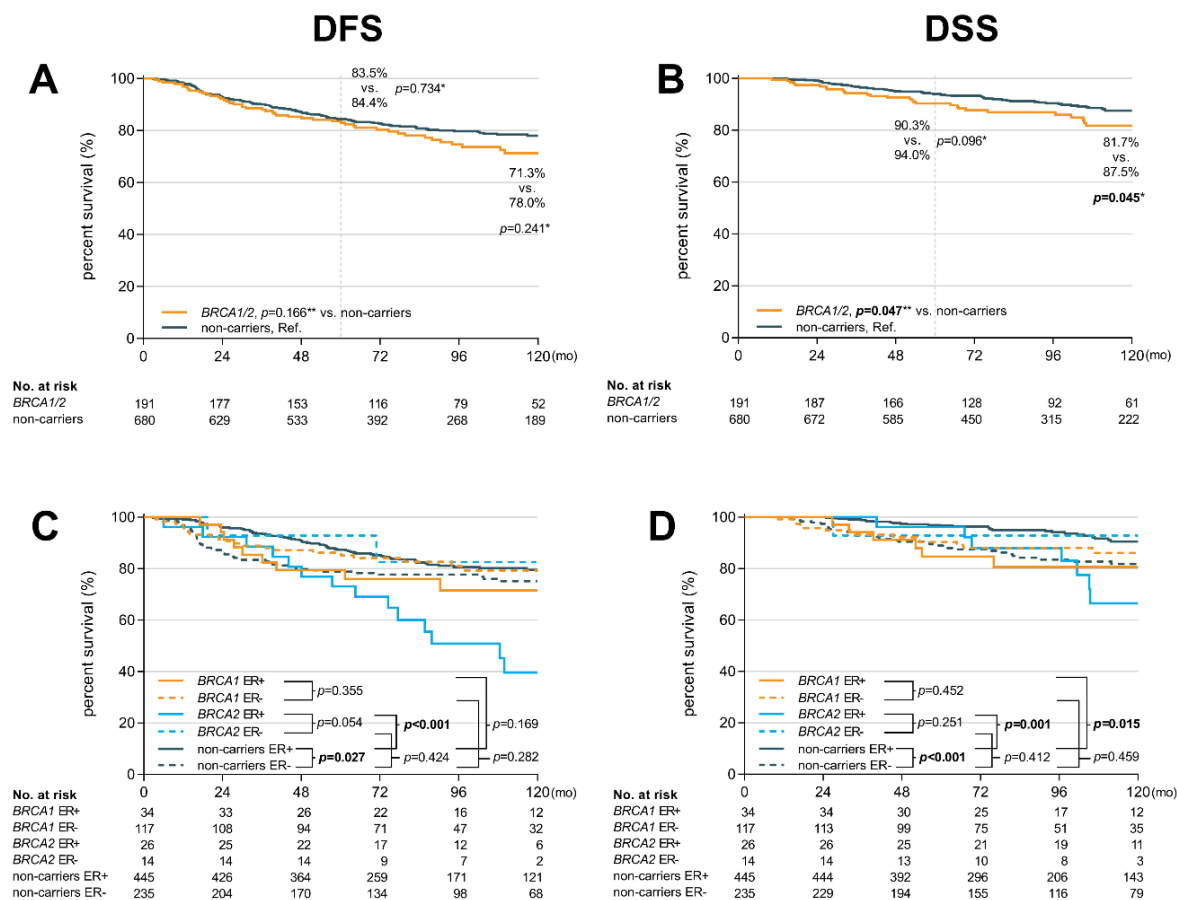
Pro zhodnocení dopadu jednotlivých klinicko-patologických charakteristik na přežití bez známek nemoci (disease free survival, DFS) a nádorově specifické přežití (disease specific survival, DSS) jsme do projektu zařadili 1133 pacientek s karcinomem prsu, jež zahrnovaly 234 nosiček *BRCA1/BRCA2* mutací a 899 nenosiček. Všechny pacientky splňovaly indikační kritéria pro genetické testování a ke genetickému vyšetření byly odeslány mezi roky 1997 až 2015. Ze souboru byly předem vyřazeny pacientky s duplicitním karcinomem ovaria, muži s karcinomem prsu a nosičky patogenních mutací v jiných genech spojených s rizikem vzniku nádorového onemocnění (*PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *TP53*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *MLH1*, *MLH3*, *NBN*, *NF1*) s cílem vytvořit co nejhomogennější soubor pacientek. V souboru převažovaly nosičky *BRCA1* mutací (N=183) nad *BRCA2* nosičkami (N=51). Medián sledování byl v celém souboru 9,8 roku. Do analýzy přežití byly zařazeny pouze pacientky s kompletními klinicko-patologickými daty, celkem tedy 191 nosiček mutací (151 *BRCA1* a 40 nosiček *BRCA2*) a 680 nenosiček.

Nosičky mutací *BRCA1/BRCA2* dosáhly mírně horšího DSS (HR 1,65 [95 % CI 1,01–2,70];  $p = 0,047$ ; [Obrázek 8A, B](#)) a srovnatelného DFS ( $p = 0.241$ ).

Následně byla provedena analýza (Mantel–Haenszel test) vlivu jednotlivých klinicko-patologických charakteristik na přežití nosiček mutací *BRCA1/BRCA2* oproti nenosičkám. V rámci souboru nosiček mutací *BRCA1/BRCA2* byl s vyšším rizikem návratu onemocnění (DFS) spojen vyšší věk patientek. U patientek starších nebo rovno 35 let v době diagnózy bylo riziko návratu nemoci zvýšeno 1,80x (95 % CI 1,10–2,99), u patientek starších nebo rovno 45 let 3,98x (95 % CI 1,62–9,81) a u postmenopausálních nosiček 3,72x (95 % CI 1,16–11,90]) v porovnání se stejně starými nenosičkami.

Analýza positivity parametru estrogenních receptorů (ER) a jeho vztahu k prognóze přinesla překvapivý výsledek. U nosiček mutací v genech *BRCA1/BRCA2* byla pozitivita ER spojena s 3,14x vyšším rizikem návratu onemocnění (95 % CI 1,69–5,81;  $p = 0,003$ ) a 5,70x vyšším rizikem úmrtí v souvislosti s karcinomem prsu (95 % CI 2,27–14,4;  $p < 0,001$ ) ve srovnání s nenosičkami (Obrázek 8C, D).

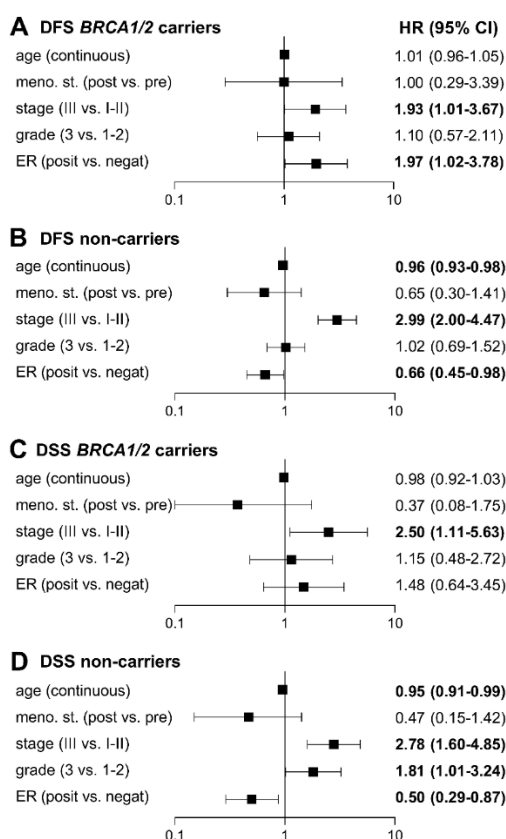
**Obrázek 8:** Kaplan-Meierovy křivky porovnávající DFS (A) a DSS (B) u nosiček *BRCA1/2* mutací ve srovnání s nenosičkami; DFS (C) a DSS (D) dle stavu estrogenových receptorů u nosiček mutace *BRCA1*, *BRCA2* a nenosiček.



Na základě faktorů identifikovaných v předchozích analýzách (věk a stav ER) jsme se rozhodli ověřit jejich kombinovaný efekt na prognózu pacientek. Nosičky mutací v genech *BRCA1/BRCA2* s ER-positivním karcinomem prsu diagnostikovaným ve věku 35 a více vykazovaly 4,56x vyšší riziko recidivy onemocnění (95 % CI 2,00–10,37) a 8,24x vyšší riziko úmrtí v souvislosti s karcinomem prsu (95 % CI 2,37–28,72]) oproti ER-positivním nenosičkám stejného věku. Podobného výsledku bylo dosaženo i u pacientek diagnostikovaných ve věku 45 a více.

U žen mladších 35 let v době diagnózy s ER-negativním karcinomem prsu bylo riziko recidivy 1,93x vyšší ve srovnání s nosičkami mutací v genech *BRCA1/BRCA2* (95 % CI 1,03–3,61;  $p = 0.039$ ). Podobný trend byl zaznamenán i ve věkové kategorii do 45 let v době diagnózy, nicméně nebylo dosaženo statistické významnosti.

K potvrzení významného vlivu věku v době diagnózy a stavu ER jsme provedli multivariační analýzu (multivariable Cox proportional-hazard model), do které jsme zahrnuli všechny parametry signifikantně rozdílné v rámci Coxovy univariační analýzy (věk, menoaaktivita, stadium onemocnění, stupeň diferenciacie tumoru a stav ER; [Obrázek 9](#)).



**Obrázek 9:** Grafické znázornění výsledků multivariační analýzy rizikových faktorů pro DFS a DSS:

Věk v době diagnózy (spojitý), menoaaktivita (postmenopauzální vs premenopauzální), stadium nemoci (III vs. I-II), stupeň diferenciacie (grade 3 vs 1-2) a stav ER (pozitivní vs. negativní).

Multivariační analýza potvrdila zcela opačný vliv stavu ER na přežívání u nosiček mutací *BRCA1/BRCA2* (negativní faktor, statisticky významný u DFS) a nenosiček (positivní prognostický faktor, statisticky významný jak u DFS, tak u DSS). Věk v době diagnózy zůstal významným faktorem pouze u nenosiček, podobně i nízký stupeň diferenciacie (statisticky významný pouze v rámci DSS).

Na základě naší analýzy je nezbytné na nosičky mutací *BRCA1/BRCA2* s ER-positivním karcinomem prsu pohlížet jako na skupinu pacientek se zvýšeným rizikem recidivy onemocnění a úmrtí v souvislosti s karcinomem prsu. Prognóza onemocnění je u těchto pacientek dokonce horší než u nenosiček mutací mladší 35 let v době diagnózy s ER-negativním karcinomem prsu, které jsou považovány za nejrizikovější populaci.

Dalším zajímavým zjištěním je srovnatelná prognóza nosiček mutace *BRCA1/BRCA2* s ER-negativním karcinomem prsu (včetně pacientek mladších 35 let) s prognózou onemocnění u (starších) nenosiček s ER-positivním karcinomem prsu, které jsou považovány za málo rizikové pacientky.

#### 4.4 Článek 4: Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer.

Kleiblova P, Stolarova L, Krizova K, Lhota F, Hojny J, Zemankova P, Havranek O, **Vocka M**, Cerna M, Lhotova K, Borecka M, Janatova M, Soukupova J, Sevcik J, Zimovjanova M, Kotlas J, Panczak A, Vesela K, Cervenкова J, Schneiderova M, Burocziowa M, Burdova K, Stranecky V, Foretova L, Machackova E, Tavandzis S, Kmoch S, Macurek L, Kleibl Z. *Int J Cancer*. 2019 May 3, doi: 10.1002/ijc.32385. (IF<sub>2017</sub>=7.360).

Gen *CHEK2* kóduje kinázu CHK2 zprostředkovávající odpověď na přítomnost dvouřetězcových zlomů v DNA. Jejimi substráty jsou proteiny aktivující zástavu buněčného cyklu/aktivaci apoptózy (např. p53) nebo reparaci DNA (např. BRCA1; viz. kap. 1.3.2.1). Zárodečné patogenní mutace v genu *CHEK2* jsou spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu, nicméně riziko vzniku onemocnění u nosiček mutací *CHEK2* bylo publikováno velmi rozdílně (Tabulka 3). Na těchto rozdílech se podílí řada faktorů, které především zahrnují neúplnou penetranci mutací *CHEK2* genu, neúplnou analýzu variant celé kódující oblasti genu, nejasný klinický význam řady nalezených variant (VUS) a velmi rozdílnou prevalenci dědičných alterací v různých populacích, která zkresluje výpočty rizika při použití dat multietnických kontrolních populačních souborů.

Cílem práce byla identifikace dědičných variant *CHEK2* genu v české populaci u 1,928 vysoce rizikových pacientů analyzovaných na nádorovou predispozici ke karcinomu prsu a ovaria a u 3,360 nenádorových kontrol, dále funkční charakterizace významu nalezených missense variant, vyčíslení rizika vzniku karcinomu prsu a ovaria u nosičů trunkačních a funkčně defektních missense variant.

V analyzovaném souboru bylo identifikováno 10 trunkačních mutací a 26 missense variant. Zatímco frekvence trunkačních mutací se významně lišila mezi souborem pacientů (2,39 % nosičů) a kontrol (0,33 % nosičů;  $p=1,1 \times 10^{-14}$ ), celková frekvence missense alterací byla srovnatelná (4,56 % vs. 3,90 %;  $p=0,42$ ). U zmiňovaných 26 missense variant bylo provedeno funkční vyšetření ve spolupráci s Ústavem molekulární genetiky Akademie věd České republiky, které umožnilo vyhodnotit enzymovou aktivitu *CHEK2*. Z hlediska poruchy funkce bylo 11 variant hodnoceno jako varianty s významnou poruchou kinázové aktivity, 5 variant s jako částečnou poruchou funkce; 10 variant prokázalo zachování plné kinázové aktivity.

**Tabulka 3.** Přehled studií a meta-analýz analyzujících význam mutací v genu *CHEK2* u pacientek s karcinomem prsu (převzato ze Soukupova J. et al, 2019).

Citace	Pop.	P: soubor pacientů C: soubor kontrol	Analýza*	Odds ratio (95%CI); <i>p</i> - poznámka
Nurmi A. et al, 2019	FI	P: 3156 ca prsu/ovaria C: 2 089 populační	c.319+2T>A	5,32 (1,58-18,45); 0,007 – neselektovaný ca prsu 6,04 (1,65-22,10); 0,007 – familiární ca prsu
Girard E. et al, 2019	FR	P: 1 207 <i>BRCA1/2</i> -negativní ca prsu a sestra s ca prsu C: 1 199 populační	<i>CHEK2</i> <sup>93</sup>	3,0 (1,9-5,0); $1 \times 10^{-5}$ – všechny varianty 5,8 (2,0-16,9); 0,001 – trunkace 2,4 (1,4-4,3); 0,002 – likely-deleterious missense
Hauke J. et al, 2018	DE	P: 5 589 <i>BRCA1/2</i> -negativní ca prsu C: 2189 nenádorové	<i>CHEK2</i> <sup>93</sup>	3,72 (1,99-6,94); <0,0001 – trunkace
Couch F.J. et al, 2017	USA	P: 29 090 ca prsu C: ExAC-NFE non-TCGA	<i>CHEK2</i> <sup>93</sup>	2,31 (1,88-2,85); $3,04 \times 10^{-17}$ – c.1100delC 2,26 (1,89-2,72); $1,75 \times 10^{-20}$ – patogenní (bez I157T a S428F) 1,48 (1,31-1,67); $1,75 \times 10^{-10}$ – libovolná varianta 1,35 (1,12-1,63); 0,0002 – bilaterální ca prsu
Decker B. et al, 2017	UK	P: 13 087 ca prsu C: 5 488	<i>CHEK2</i> (4 geny)	3,11 (2,15-4,69); $5,6 \times 10^{-11}$ – trunkace 1,36 (0,99-1,87); 0,066 – všechny raritní missense 1,51 (1,02-2,24); 0,047 – raritní missense v doménách 3,27 (1,66-5,83); 0,0014 – bilaterální ca prsu
Slavin T.P. et al, 2017	USA	P: 2 266 <i>BRCA1/2</i> -negat. ca prsu a $\geq 2$ příbuzní s ca prsu/ovaria do 70 C: ExAC	<i>CHEK2</i>	1,62 (1,03-2,51); 0,04 - trunkační mutace
Schmidt M.K. et al, 2016	BCAC	44 777 BC 42 977 PMC	c.1100delC	2,26 (1,90-2,69); $2,3 \times 10^{-20}$ – invazivní ca prsu 2,55 (2,10-3,10); $4,9 \times 10^{-21}$ – ER-pozitivní ca prsu 1,32 (0,93-1,88); 0,12 – ER-negativní ca prsu
Southey M.C. et al, 2016	BCAC	P: 42 671 C: 42 164	Vybrané varianty	2,26 (1,29-3,95); 0,02 – pro variantu p.R117G 1,33 (1,05-1,67); 0,015 – pro variantu p.R117G 1,70 (0,73-3,93); 0,210 – pro variantu p.E239K 5,06 (1,09-23,5); 0,017 – pro variantu p.R346C 1,03 (0,62-1,71); 0,910 – pro variantu p.D438Y
Cybulski C. et al, 2011	PL	P: 7 494 ca prsu (negativní founder <i>BRCA1</i> mutace) C: 4 346	c.1100delC, c.444+1G>A, del5395	3,6 (2,6-5,1) – všechny ca prsu 3,3 (2,3-4,7) – ca prsu bez pozitivní RA 5,0 (3,3-7,6) – ca prsu + ca prsu v 1. nebo 2. linii v RA 7,3 (3,2-16,8) – ca prsu + ca prsu v 1. a 2. linii v RA
Desrichard A. et al, 2011	FR	P: 507 <i>BRCA1/2</i> -negativních ca prsu C: 513 nenádorové	<i>CHEK2</i>	4,15 (1,38-12,50); 0,0065 – všechny <i>CHEK2</i> varianty 5,18 (1,49-18,00); 0,0042 – patogenní <i>CHEK2</i> mutace
Le Calvez-Kelm et al, 2011	US, AU	P: 1 303 ca prsu $\leq 45$ let C: 1 109 nenádorové ženy	<i>CHEK2</i>	6,18 (1,76-21,8) – trunkace 2,20 (1,20-4,01) – raritní missense
Liu Y. et al, 2011	CN	P: 909 neselektovaných ca prsu C: 1 229 zdravé	c.1111C>T (p.H371Y)	2,43 (1,07-5,52); 0,034 – neselektovaný ca prsu 5,99 (1,98-18,89) – familiární ca prsu
Weischer M. et al, 2007	DK	P: 1101 s ca prsu C: 4665	c.1100delC	3,2 (1,0-9,9) – ca prsu (prospektivní studie) 2,6 (1,3-5,4) – ca prsu (case control studie)
Cybulski C. et al, 2004	PL	P: 1 017 ca prsu C: 4 000 populační	c.1100delC; c.444+1G>A; p.I157T	2,2; <i>p</i> =0,02 – pro variantu c.1100delC and c.444+1G>A 1,4; <i>p</i> =0,02 – pro variantu p.I157T
Dufault M.R. et al, 2004	DE	P: 516 <i>BRCA1/2</i> -negativních ca prsu C: 1 315 náhodné	<i>CHEK2</i>	3,44 (1,19-9,95); 0,016 – pro variantu c.1100delC 3,9 (1,3-10,9) – pro varianty c.1100delC a c.1214del4
CHEK2 konsorcium, 2004	UK, NL, FI, DE, AU	P: 10 860 ca prsu C: 9 065	c.1100delC	2,34 (1,72-3,20); $1 \times 10^{-7}$ 2,23 (1,60-3,11) – ca prsu bez příbuzné s ca prsu v 1. linii 3,12 (1,90-5,15) – ca prsu + 1 ca prsu v 1. linii v RA 4,17 (1,26-13,75) – ca prsu + $\geq 2$ ca prsu v 1. linii v RA
Vahteristo P. et al, 2002	FI	P: 1035 neselektovaných ca prsu C: 1885	c.1100delC	1,48 (0,83-2,65); 0,182 neselektovaný ca prsu 2,27 (1,11-4,63); 0,021 ca prsu + ca prsu v RA 6,17 (1,87-20,32); 0,007 bilaterální ca prsu
Liang M. et al, 2018	meta	P: 118 735 ca prsu C: 195 807	c.1100delC	2,88 (2,65-3,22) – ca prsu u žen 2,87 (1,85-4,47) – ca prsu u mladých žen 3,21 (2,41-4,29) – familiární ca prsu 3,13 (1,94-5,07) – ca prsu u mužů
Han F.F. et al, 2013	meta	P: 15 985 ca prsu C: 18 609	p.I157T	1,58 (1,42-1,75); <0,0001
Liu C. et al, 2012	meta	P: 19 621 ca prsu C: 27 001	p.I157T	1,48 (1,31-1,68); <0,0001 – neselektovaný ca prsu 1,48 (1,16-1,89); <0,0001 – familiární ca prsu 1,47 (1,29-1,66); <0,0001 – ca prsu u mladých pac. 4,17 (2,89-6,03); <0,0001 – lobulární ca prsu
Yang Y. et al, 2012	meta	P: 29 154 ca prsu C: 37 064	c.1100delC	2,33 (1,79-3,05) – neselektovaný ca prsu 3,72 (2,61-5,31) – familiární ca prsu 2,78 (2,28-3,39) – mladé pacientky
Zhang B. et al, 2011	meta	P: 9 970/C: 7 526 P: 13 331/C: 10 817 P: 10 543/C: 10 817 P: 4 1791/C: 50 910	c.444+1G>A p.I157T del5395 c.1100delC	3,07 (2,03-4,63); $9,82 \times 10^{-8}$ – pro variantu c.444+1G>A 1,52 (1,31-1,77); $4,76 \times 10^{-8}$ – pro variantu p.I157T 2,53 (1,61-3,97); $6,33 \times 10^{-5}$ – pro variantu del5395 3,10 (2,59-3,71); <10 <sup>-20</sup> – pro variantu c.1100delC
Weischer M. et al, 2008	meta	P: 26 488 C: 27 402	c.1100delC	2,7 (2,1-3,4) – neselektovaný ca prsu 2,6 (1,3-5,5) – ca prsu u mladých žen 4,8 (3,3-7,2) – familiární ca prsu

Pozn. Pop. = populace; meta = meta-analýza

Zjištěná rizika spojená s nosičstvím mutací v genu *CHEK2* jsou uvedena v [tabulce 4](#). Riziko je klinicky významné pro truncační varianty a vznik karcinomu prsu u žen, ale i u mužů, asociace s karcinomem ovaria je významná méně. Funkčně defektní missense varianty jsou spojeny s pravděpodobně nižším rizikem než truncační mutace.

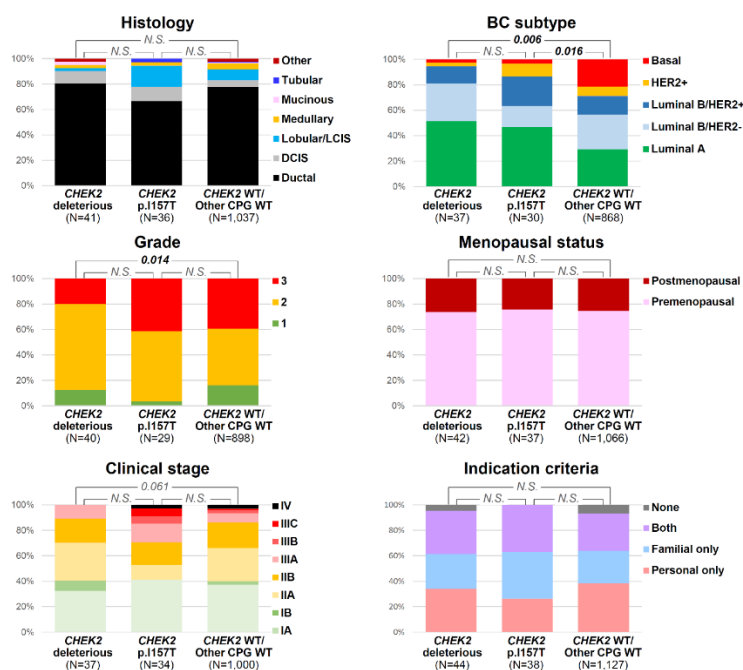
**Tabulka 4:** Prevalence patogenních variant genu *CHEK2*. Rizika byla stanovena pro jednotlivé diagnostické podskupiny. Riziko bylo vypočteno oproti frekvenci uvedených variant v kontrolním souboru z české populace.

Skupiny dle diagnóz (skupina) Klasifikace <i>CHEK2</i> variant	Všichni pacienti		
	N (%)	OR (95 % CI)	p
<b>Unilaterální ca prsu - ženy (I)</b>	<b>N=1,298</b>		
Trunkace	33 (2,54)	<b>7,94 (3,90-17,47)</b>	<b>9,4×10<sup>-11</sup></b>
Nefunkční missense	9 (0,69)	<b>3,90 (1,24-13,35)</b>	<b>0,009</b>
Částečně funkční missense	38 (2,93)	0,90 (0,60-1,32)	0,64
Plně funkční missense	12 (0,92)	1,79 (0,75-4,11)	0,14
<b>Bilaterální ca prsu - ženy (II)</b>	<b>N=149</b>		
Trunkace	4 (2,68)	<b>8,39 (1,92-28,74)</b>	<b>0,003</b>
Nefunkční missense	1 (0,67)	3,77 (0,08-31,42)	0,26
Částečně funkční missense	6 (4,03)	1,25 (0,44-2,88)	0,63
Plně funkční missense	0	-	-
<b>Ca prsu - muži (III)</b>	<b>N=48</b>		
Trunkace	3 (6,25)	<b>20,21 (3,50-80,00)</b>	<b>8,6×10<sup>-4</sup></b>
Nefunkční missense	1 (2,08)	11,87 (0,25-100,83)	0,10
Částečně funkční missense	2 (4,17)	1,30 (0,15-5,07)	0,67
Plně funkční missense	2 (4,17)	<b>9,07 (0,98-40,41)</b>	<b>0,03</b>
<b>Duplicita ca prsu a ovaria (IV)</b>	<b>N=79</b>		
Trunkace	3 (3,80)	<b>11,99 (2,11-46,60)</b>	<b>0,004</b>
Nefunkční missense	1 (1,27)	7,15 (0,15-59,97)	0,15
Částečně funkční missense	3 (3,80)	1,18 (0,24-3,67)	0,74
Plně funkční missense	0	-	-
<b>Pouze ca ovaria (V)</b>	<b>N=354</b>		
Trunkace	3 (0,85)	2,60 (0,46-9,91)	0,14
Nefunkční missense	3 (0,85)	<b>4,77 (0,77-22,47)</b>	<b>0,047</b>
Částečně funkční missense	9 (2,54)	0,78 (0,34-1,55)	0,63
Plně funkční missense	3 (0,84)	1,79 (0,33-6,28)	0,42
<b>Jakýkoliv ca prsu - ženy (I+II+IV)</b>	<b>N=1,526</b>		
Trunkace	40 (2,62)	<b>8,19 (4,11-17,75)</b>	<b>4,1×10<sup>-12</sup></b>
Nefunkční missense	11 (0,72)	<b>4,06 (1,37-13,39)</b>	<b>0,006</b>
Částečně funkční missense	47 (3,08)	0,95 (0,66-1,35)	0,79
Plně funkční missense	11 (0,72)	1,52 (0,64-3,49)	0,30
<b>Jakýkoliv ca ovaria (IV+V)</b>	<b>N=433</b>		
Trunkace	6 (1,39)	<b>4,28 (1,29-12,69)</b>	<b>0,009</b>
Nefunkční missense	4 (0,92)	<b>5,21 (1,08-22,06)</b>	<b>0,02</b>
Částečně funkční missense	12 (2,77)	0,91 (0,45-1,73)	0,88
Plně funkční missense	3 (0,69)	1,12 (0,12-5,44)	0,70



Klinicko-patologické charakteristiky byly porovnávány mezi skupinou pacientů s truncačními nebo patogenními missence variantami (N = 44), skupinou pacientů s mutací p.I157T (N = 38) a skupinou pacientů bez identifikované *CHEK2* mutace (N = 1127, **Obrázek 10**). Statisticky významný rozdíl byl identifikován při hodnocení subtypů karcinomu prsu, kdy byl mezi pacienty bez mutace v genu *CHEK2* zaznamenán významně vyšší podíl basal-like subtypu a u nosičů mutace p.I157T vyšší podíl HER-2+ tumorů. Dále byl zaznamenán rozdíl ve stupni diferenciacie tumoru mezi nosiči truncačních nebo patogenních missence variant (významně častěji se vyskytoval stupeň 2) a pacienty bez mutace (významně častěji se jednalo o stupeň 3).

Práce dokumentuje zásadní význam v detekci CNV pomocí panelového NGS. Analýza funkčního významu umožní klasifikovat všechny nalezené VUS popsané CZECANCA konsorciem, což zvýší klinickou výpovědní hodnotu analýz u vysoce rizikových pacientů.



**Obrázek 10:** Klinicko-patologické charakteristiky 1,209 analyzovaných pacientů s karcinomem prsu rozdělené dle přítomnosti mutací genu *CHEK2* na patogenní, p.I157T a bez mutace.

**A.** zastoupení histologických typů; **B.** zastoupení subtypů karcinomu prsu; **C.** zastoupení stupně diferenciacie; **D.** zastoupení pre- a postmenopausálních pacientek; **E.** – zastoupení klinického stádia; **F.** – zastoupení indikačních kritérií

Prezentovaná data potvrdila klinický význam analýzy genu *CHEK2* u pacientek vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu nebo karcinomu vaječníku. Analýza byla podpořena provedením funkčních analýz, což vedlo k významnému snížení počtu variant nejasného významu (VUS). Další hodnocení je ztěžováno faktem, že patogenní mutace v *CHEK2* často asociují s jinými tumory než jen s karcinomem prsu a vaječníku a je tedy nutné vytvořit velké soubory pacientů spolu s podrobnými klinicko-patologickými informacemi v rámci mezinárodní spolupráce.



#### 4.5 Článek 5: Trefoil factor family (TFF) proteins as potential serum biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer.

**Vocka M**, Langer D, Petrtyl J, Vockova P, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. *Neoplasma*. 2015;62<sup>13</sup>:470-7, (IF<sub>2015</sub>=1.961)

V rámci dlouhodobé spolupráce s Ústavem lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky jsme zkoumali nové diagnostické a prognostické nádorové markery u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem ve snaze stratifikovat pacienty dle prognózy a vybrat vhodné kandidáty pro případné radikální resekcí výkony v oblasti jater, event. v kombinaci s resekcemi primární tumoru. Rešerší dostupné literatury jsme identifikovali 32 proteinových markerů spojených s diagnostikou kolorektálního karcinomu, které byly následně vyšetřeny v našem souboru spolu se základním vyšetřením biochemie a krevního obrazu.

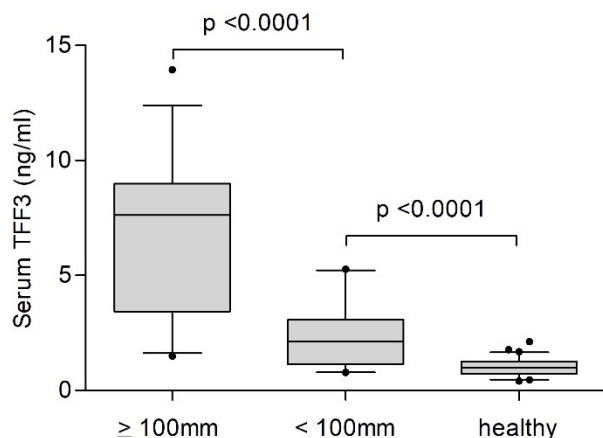
Trefoil faktory (TFF) jsou stabilní sekretorické proteiny produkované buňkami sliznice gastrointestinálního traktu. Jejich přesná funkce není známa, nicméně se pravděpodobně podílejí na ochraně sliznice před poškozením, stabilizují hlenovou vrstvu a ovlivňují hojení epitelu.

V rámci zkoumané skupiny byly získány sérové vzorky 97 pacientů s histologicky verifikovaným metastatickým kolorektálním karcinomem (u 58 z nich byly k dispozici sérové vzorky s odstupem 3 měsíců) a 59 zdravých kontrol s negativní kolonoskopií předcházející odběru. Koncentrace TFF-1, TFF-2 a TFF-3 ve vzorcích séra byly stanoveny komerčně dostupnými kolorimetrickými sendvičovými ELISA kity (Biovendor). Zároveň byla provedena analýza standardních nádorových markerů (CEA, CA19-9) a ze zdravotnické dokumentace byly získány informace o rozsahu onemocnění, způsobu terapie a o celkovém přežití.

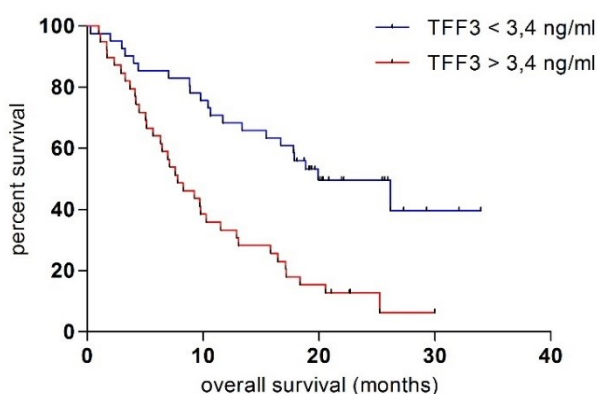
Sérové koncentrace TFF-1 a TFF-3 se významně lišily u pacientů ve srovnání s kontrolní skupinou. Koncentrace TFF-2 se mezi pacienty a kontrolami nelišila. V další analýze pak TFF-2 prokázal horší sensitivitu než rutinně využívaný tumor marker CEA, z další analýzy byl tedy vyřazen. Sérový protein TFF-3 (AUC 0,916) prokázal mírně lepší detekční schopnost ve srovnání se standardními nádorovými markery CEA (AUC 0,905) a CA19-9 (AUC 0,802).

Sérové koncentrace TFF-3 významně korelovaly s rozsahem jaterního postižení (**Obrázek 11**).

**Obrázek 11:** Sérové koncentrace TFF-3 (ng/ml) u pacientů s jaterními metastázami.



Dále bylo zjištěno, že vstupní sérová koncentrace TFF-3 koreluje s mediánem celkového přežívání u pacientů na rozdíl od vstupních sérových hladin CEA a CA19-9, které tuto korelaci nevykazovaly. V rámci analýzy byli porovnáváni pacienti se vstupní koncentrací TFF-3 menší nebo rovnou vypočtené mezní hodnotě 3,4 ng/ml s mediánem celkového přežití 19,9 měsíce proti pacientům s hodnotou vyšší než 3,4ng/ml, kteří dosáhli mediánu 7,8 měsíce ( $p < 0.0001$ ; Obrázek 12).



**Obrázek 12:** Kaplan-Meierovy křivky celkové přežití u pacientů se vstupní hladinou TFF-3 menší nebo rovnou 3,4 ng/ml proti pacientům s hladinou vyšší než 3,4 ng/ml ( $p < 0.0001$ ).

Z uvedených dat vyplývá, že sérové koncentrace signifikantně korelují s prognózou pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. Pacienti s nízkými sérovými koncentracemi TFF-3 jsou vhodnými kandidáty pro pokus o radikální resekci jaterních metastáz a event. i primárního tumoru (v případě, že již nebyl odstraněn).

#### 4.6 Článek 6: Growth/differentiation factor 15 (GDF-15) as new potential serum marker in patients with metastatic colorectal cancer.

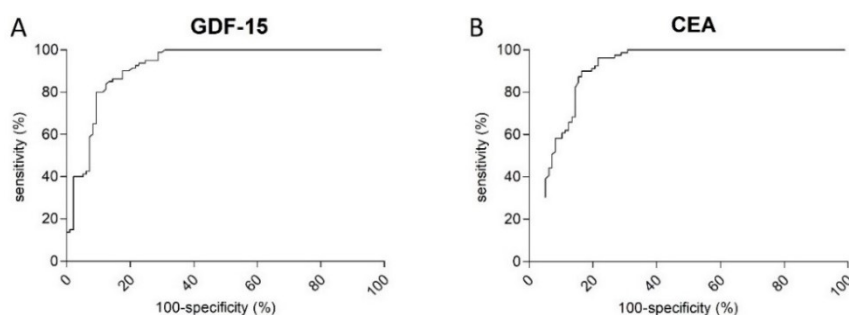
**Vocka M**, Langer D, Fryba V, Petrtyl J, Hanus T, Kalousova M, Zima T, Petruzelka L. *Cancer Biomark.* 2018;21(4):869-874, (IF<sub>2018</sub>=2.274).

Dalším z potenciálně využitelných nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem vybraných v rámci rešerše dostupné literatury byl protein GDF-15. GDF-15 funguje jako ligand vážící se na TGFβ receptory a účastní se reakce tkání na poškození buněk, zánět nebo hypoxii.

V návaznosti na předchozí data byly provedeny další ELISA analýzy s cílem nalézt další potenciální nádorové markery, jež byly vytipovány z dostupné literatury. Byly využity tytéž vzorky jako v předchozí analýze, tedy 97 pacientů s histologicky verifikovaným kolorektálním karcinomem a 79 zdravých kontrol s negativní kolonoskopií. Koncentrace GDF-15 ve vzorcích séra byla stanovena komerčně dostupnými ELISA kity (Biovendor).

Kromě významného rozdílu koncentrace GDF-15 u pacientů ( $7,58 \pm 0,77$  ng/ml) oproti zdravým kontrolám ( $1,64 \pm 0,08$  ng/ml;  $p < 0,001$ ) byl zaznamenán výrazný rozdíl u pacientů s ponechaným primárním tumorem střeva nebo lokální recidivou v oblasti střeva a pacientů bez tohoto postižení ( $10,76 \pm 2,19$  ng/ml vs  $3,93 \pm 0,33$  ng/ml;  $p = 0,035$ ). Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán i mezi pacienty s jaterním postižením oproti nemocným bez jaterního postižení ( $8,93 \pm 1,03$  ng/ml vs  $4,26 \pm 0,42$  ng/ml;  $p = 0,006$ ). Naopak koncentrace GDF-15 byly vyšší u pacientů bez postižení plicního parenchymu ve srovnání s pacienty s postižením plic ( $8,86 \pm 1,04$  ng/ml vs  $4,87 \pm 0,77$  ng/ml;  $p = 0,015$ ).

Mezní hodnota byla pro GDF-15 stanovena na 3,5 ng/ml, při které bylo dosaženo sensitivity 71,1 % při specifitě 98,7 % (AUC 0,921). Pro srovnání sérový marker CEA při mezní hodnotě 5 ug/l dosáhl mírně vyšší sensitivity 72,1 %, nicméně při mírně nižší specifitě 97,5 % (AUC 0,905; [Obrázek 13](#)).



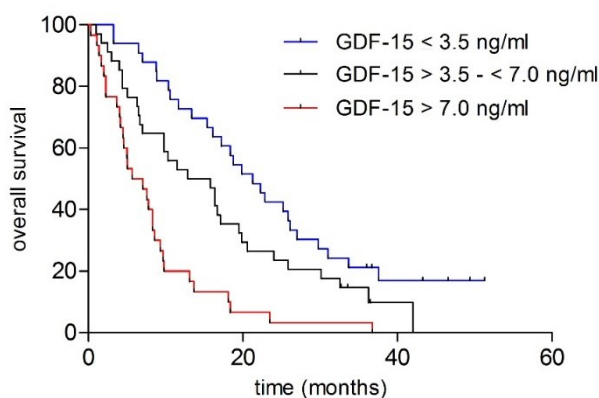
**Obrázek 13: ROC křivky.**

**A.** GDF-15 (AUC 0,921),

**B.** CEA (AUC 0,905)

Podobně jako u sérového markeru TFF-3 korelovala hladina GDF-15 s rozsahem jaterního postižení. Pacienti se součtem největšího rozměru jaterních metastáz menším než 100 mm měli vstupní koncentraci GDF-15  $5,05 \pm 0,92$  mg/ml, zatímco pacienti se součtem jaterních metastáz větším než 100 mm měli koncentraci  $13,36 \pm 1,97$  mg/ml ( $p = 0.002$ ).

Vstupní sérová koncentrace GDF-15 korelovala s celkovým přežíváním pacientů. Pacienti se vstupní koncentrací GDF-15 menší nebo rovnu vypočtené mezní hodnotě 3,5 ng/ml měli medián celkového přežití 20,6 měsíce oproti pacientům s hodnotou v rozmezí 3,5 a 7,0 ng/ml s mediánem 14,6 měsíce ( $p = 0.053$ ) a pacientům s hodnotou vyšší než 7,0 ng/ml s mediánem 6,4 měsíce ( $p < 0.001$ ; [Obrázek 14](#)).



**Obrázek 14:** Kaplan-Meierovy křivky celkového přežití pacientů dle vstupní koncentrace GDF-15.

Vstupní koncentrace GDF-15 menší nebo rovna vypočtené mezní hodnotě 3,5 ng/ml (medián celkového přežití 20,6 měsíce) oproti pacientům s hodnotou v rozmezí 3,5 a 7,0 ng/ml (medián 14,6 měsíce;  $p = 0.053$ ) a pacientům s hodnotou vyšší než 7,0 ng/ml s mediánem 6,4 měsíce ( $p < 0.001$ ).

Podobně jako předchozí publikace měla tato práce za cíl hodnotit pomocí sérového nádorového markeru rozsah nádorového postižení a identifikovat pacienty, kteří by profitovali z chirurgické terapie i přes možnou hraniční indikaci na základě zobrazovacího vyšetření. Zároveň bylo cílem identifikovat pacienty s potenciálně rychlou progresí onemocnění, stejně jako snaha vyhnout se intenzivním režimům, jež by mohly vést ke zhoršení kvality života.

#### 4.7 Článek 7: International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study.

Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, Lugli A, Zlobec I, Rau TT, Berger MD, Nagtegaal ID, Vink-Börger E, Hartmann A, Geppert C, Kolwelter J, Merkel S, Grützmann R, Van den Eynde M, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Léonard D, Remue C, Wang JY, Bavi P, Roehrl MHA, Ohashi PS, Nguyen LT, Han S, MacGregor HL, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Masucci GV, Andersson EK, Zavadova E, **Vocka M**, Spacek J, Petruzelka L, Konopasek B, Dunder P, Skalova H, Nemejcova K, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Ciliberto G, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Fredriksen T, Buttard B, Angelova M, Vasaturo A, Maby P, Church SE, Angell HK, Lafontaine L, Bruni D, El Sissy C, Haicheur N, Kirilovsky A, Berger A, Lagorce C, Meyers JP, Paustian C, Feng Z, Ballesteros-Merino C, Dijkstra J, van de Water C, van Lent-van Vliet S, Knijn N, Muşină AM, Scripcariu DV, Popivanova B, Xu M, Fujita T, Hazama S, Suzuki N, Nagano H, Okuno K, Torigoe T, Sato N, Furuhashi T, Takemasa I, Itoh K, Patel PS, Vora HH, Shah B, Patel JB, Rajvik KN, Pandya SJ, Shukla SN, Wang Y, Zhang G, Kawakami Y, Marincola FM, Ascierto PA, Sargent DJ, Fox BA, Galon J. *Lancet*. 2018;391(10135):2128-2139, (IF<sub>2018</sub>=47.831)

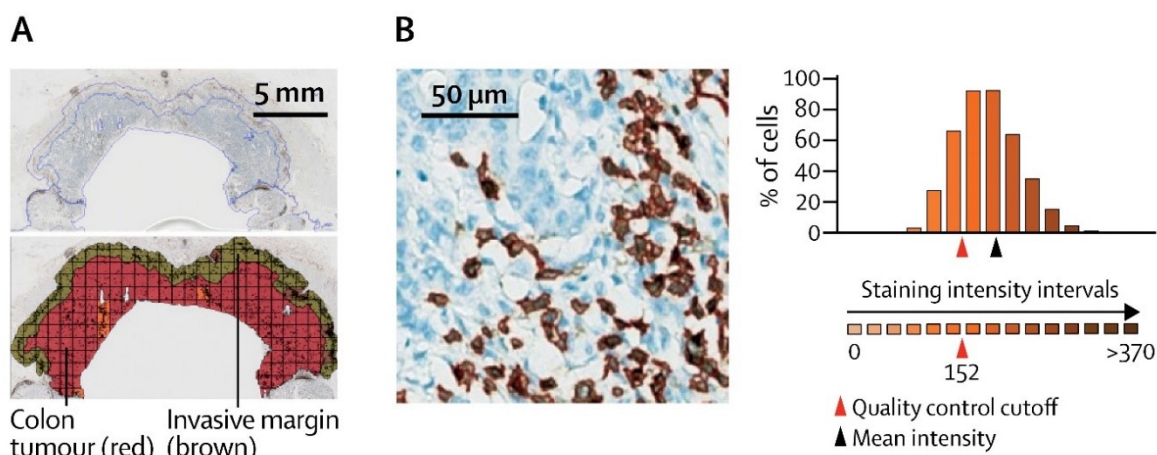
Kromě sérových hladin nejrozličnějších proteinových markerů se na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN zabýváme také sledováním jednotlivých subpopulací buněk imunitního systému a jejich vztahu k prognóze pacientů s kolorektálním karcinomem. Vedle periferní krve jsou předmětem našeho zájmu také buňky imunitního systému přestupující z krevního řečiště do tkání, a to zejména do nádorového mikroprostředí. Přítomnost těchto buněk v nádorové tkáni má prognostický význam potvrzený řadou dříve publikovaných studií.

V rámci tohoto projektu byly vyšetřeny parafinové vzorky lokalizovaného karcinomu střeva (stádium I-III) více než 3500 pacientů (necelých 250 vzorků pocházelo z Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN). Projektu se zúčastnilo 14 velkých center ze 13 zemí. Tyto vzorky byly vyšetřeny ve spolupráci s kooperujícím pracovištěm v Erlangenu (Pathologisches Institut Universitätsklinikum, Erlangen, Německo) v rámci mé stáže na tomto pracovišti. Zároveň byla k těmto výsledkům přidána anonymizovaná klinická a histopatologická data získaná ze zdravotnické dokumentace.

Jednotlivé preparáty byly imunohistochemicky obarveny protilátkami proti CD3 a CD8, následně vzorky prošly kontrolou kvality a poté byla provedena kvantifikace pozitivních buněk pomocí počítačového softwaru (obrázek 15).

**Obrázek 15: Stanovení četnosti imunitních buněk pomocí softwaru pro analýzu obrazu s vyhrazeným modulem Immunoscore.**

**A.** Vzorek tkáně je rozdělen na sektory, přičemž nádorová tkáň je zvýrazněna červenou a invazivní okraj hnědou barvou. **B.** Reprezentativní imunohistochemické barvení na CD3+ buňky infiltrující nádor tlustého střeva (vlevo, hnědá) a histogram intenzity barvení pozitivních buněk detekovaných softwarem (vpravo).



Po kontrole kvality bylo do studie zařazeno 2681 pacientů s kompletními daty a zároveň dostatečnou kvalitou parafinových vzorků (700 pacientů v tréninkové skupině, 636 pacientů v interním validačním souboru a 1345 pacientů v externím validačním souboru). Immunoscore prokázalo vysokou úroveň reprodukovatelnosti mezi pozorovateli a centry ( $r = 0,97$  pro nádor tlustého střeva;  $r = 0,97$  pro invazivní okraj;  $p < 0,0001$ ).

V tréninkovém souboru měli pacienti s vysokým Immunoscore nejnižší riziko recidivy po 5 letech (8 % u pacientů s vysokým Immunoscore oproti 19 % se střední hodnotou a 32 % s nízkou hodnotou Immunoscore). Poměr rizika [HR] mezi vysokou a nízkou hodnotou byl 0,2 (95 % CI 0,1-0,38;  $p < 0,0001$ ). Výsledky byly následně potvrzeny ve dvou validačních souborech s celkovým počtem 1981 pacientů. Provedená Coxova multivariační analýza prokázala asociaci Immunoscore a času do recidivy nezávislou na věku pacienta, pohlaví, stádiu T, rozsahu postižení lymfatických uzlin a mikrosatelitové (in)stabilitě.

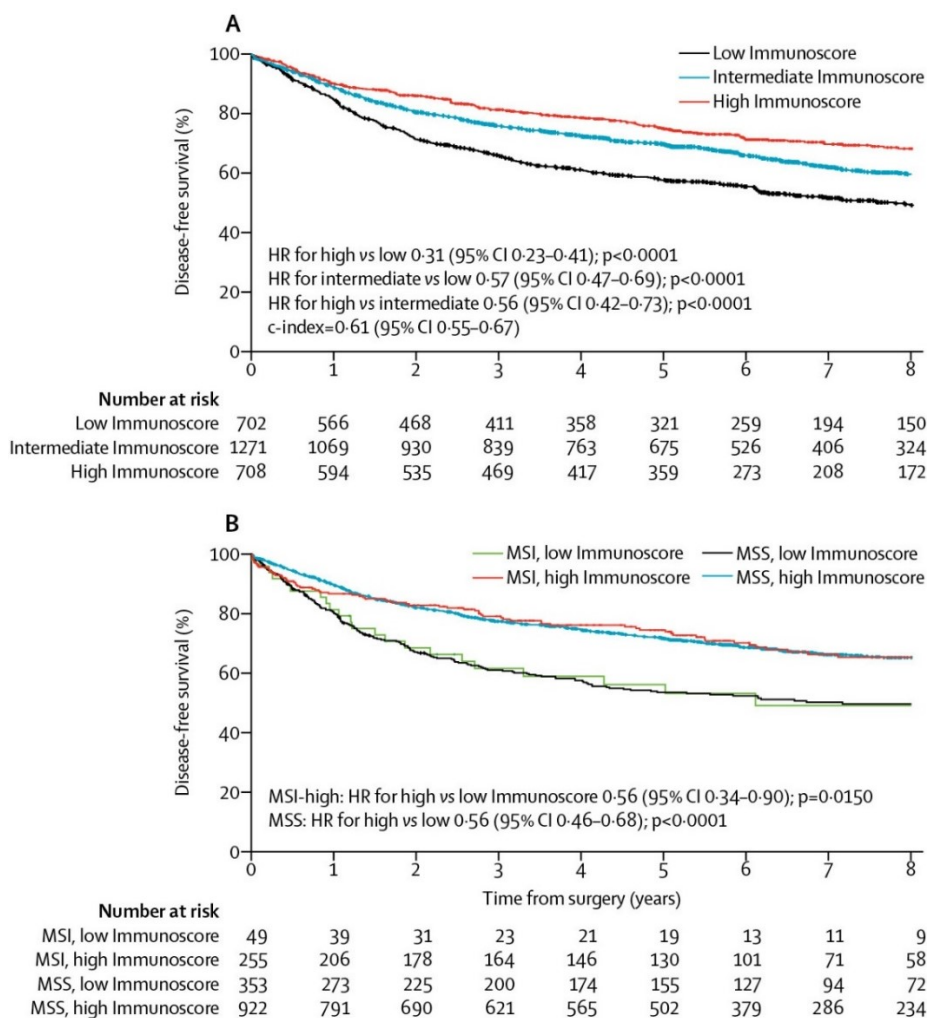
Z celkového počtu 1434 pacientů s karcinomem stadia II byl rozdíl v riziku recidivy po 5 letech významný (HR pro vysoké vs. nízké Immunoscore 0,33 (95 % CI = 0,21-0,52;  $p < 0,0001$ ).



### Obrázek 16: Kaplan-Meierovy křivky přežití dle hodnoty Immunoscore.

**A.** Kaplan-Meierovy křivky přežití bez návratu onemocnění dle Immunoscore nezávisle na vstupním TNM stádiu; **B.** Kaplan-Meierovy křivky přežití pro kombinaci mikrosatelitové instability/stability a Immunoscore (skupina low odpovídá skupině s nízkým skóre z části A; skupina high pak odpovídá spojení skupiny středního a vysokého rizika z části A)

*MSI = mikrosatelitová nestabilita; MSS = mikrosatelitová stabilita*



Zmiňovaná práce potvrdila prognostický význam počtu tumor infiltrujících lymfocytů hodnocených v centru tumoru a v oblasti invazivního okraje. Na základě těchto výsledků je možno identifikovat pacienty s vysokým rizikem relapsu onemocnění nezávisle na stádiu onemocnění, které je jedním ze základních kamenů při rozhodování o onkologické terapii navazující na chirurgický výkon. Dalším důležitým zjištěním je nezávislost prognostické hodnoty Immunoscore na mikrosatelitové nestabilitě. Zavedení kvantitativního stanovení počtu buněk pomocí softwaru umožňuje dosahovat téměř identických výsledků nezávisle na pracovišti nebo hodnotiteli. Právě tato vlastnost umožňuje široké využití tohoto vyšetření v rutinní klinické praxi.

## 5 ZÁVĚR

Ve své dizertační práci jsem se věnoval analýzám prediktivních a prognostických faktorů u nemocných s karcinomem prsu a kolorekta a hodnocení jejich klinického významu.

Analýzy pacientek s dědičnou formou karcinomu prsu léčených na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN probíhají na Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK od roku 1997. Počáteční sekvenování jednotlivých nádorových predispozičních genů se však stále více ukazovalo jako časově i ekonomicky nevýhodné. Uvedení masivního paralelního sekvenování nové generace na počátku tohoto desetiletí skýtá nové možnosti pro diagnostiku širokého spektra predispozičních genů.

V první studii proveditelnosti bylo panelem 581 genů na platformě SOLiD analyzováno 325 vysoce rizikových pacientů s karcinomem prsu, u kterých byla vyloučena mutace v hlavních predispozičních genech *BRCA1/BRCA2/PALB2* a 105 nenádorových kontrol. Patogenní či pravděpodobně patogenní mutace jsme našli u téměř třetiny vyšetřovaných vysoce rizikových osob, přičemž u 30/325 nemocných (9 %) jsme tyto mutace našli v genech prokazatelně asociovaných s dědičnými nádorovými syndromy. Práce ukázala, že panelové NGS je vhodným přístupem k analýze hereditárních dispozic ke vzniku nádorových onemocnění, které umožňuje v relativně krátkém čase získat výsledky analýzy několika stovek genů. Na druhé straně velikost panelu cíleného na analýzu 581 genů ukázala, že pro řadu alterací nejsme schopni postihnout jejich možný význam s ohledem na nádorovou predispozici.

V návaznosti na zkušenosti s analýzou s široce koncipovaným panelem 581 genů z předchozí práce byl připraven panel CZEKANCA v. 1.0, který zahrnoval 219 genů s prokázaným nebo předpokládaným zvýšením rizika vzniku dědičných nádorových onemocnění. Zároveň bylo nutné vytvořit robustní analytický postup, který by bylo možné využívat v různých laboratořích v České republice, tak aby bylo možné získat výsledky z vyšetření rozsáhlé skupiny nemocných. Vyšetření velkého souboru indikovaných osob je nezbytným předpokladem pro získání dostatečného množství nosičů mutací pro stanovení relativního rizika spojeného s přítomností dědičné mutace, a to i v případě genů, jejichž mutace nejsou v populaci příliš časté. U raritních alterací vyžadují analýzy rizika vytvoření souborů v řádu desítek tisíc pacientů v rámci mezinárodních konsorcií.



Výsledky validační studie potvrdily, že panel CZEKANCA umožňuje spolehlivou detekci nejen SNV a malých inzercí nebo delecí, ale také hodnocení rozsáhlejších přestaveb u většiny vyšetřovaných genů. Provedené analýzy také prokázaly uniformitu bioinformatického zpracování všech vzorků členů CZEKANCA konsorcia, které umožňuje sloučení mezilaboratorních výsledků pro vytvoření frekvenční databáze hereditárních variant predispozičních genů u vysoce rizikových osob v ČR.

Spojení informací získaných z molekulárních analýz s klinicko-patologickými charakteristikami dlouhodobě sledovaných pacientek s karcinomem prsu umožňuje srovnání těchto charakteristik u nosiček a nenosiček mutací a následně vyhodnocení jejich prognostického významu u obou skupin. V současné době reprezentuje NGS pomocí CZEKANCA panelu rutinní vyšetření v devíti laboratořích v ČR, díky němuž byly získány informace o genotypových charakteristikách studovaných genů u více než 6200 vyšetřovaných vysoce rizikových pacientů s různými onkologickými diagnózami. Nejčastěji analyzovanými probandy byly pacientky s karcinomem prsu, u kterých byla nejčastěji nalezena mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2* a *CHEK2*.

Důležitým prognostickým a prediktivním ukazatelem u pacientek s karcinomem prsu je exprese ER, avšak význam tohoto faktoru u podskupiny nosiček mutací v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*, která tvoří kolem 5 % všech případů, nebyl dokumentován, přestože se karcinomy prsu z hlediska exprese estrogenních receptorů u nosiček mutací obou genů významně odlišují. Dlouhodobé zaměření naší kliniky na pacientky s dědičnou formou karcinomu prsu umožnilo nashromáždit dostatečný počet případů pacientek s mutacemi v genech *BRCA1* a *BRCA2*. V naší práci jsme se zaměřili na porovnání významu jednotlivých klinicko-patologických charakteristik na přežití bez známek nemoci (disease free survival, DFS) a nádorově specifické přežití (disease specific survival, DSS) u pacientek s karcinomem prsu s dědičnými mutacemi *BRCA1/BRCA2* a bez mutací.

Do analýzy jsme zařadili 1133 pacientek s karcinomem prsu, jež zahrnovaly 234 nosiček *BRCA1/BRCA2* mutací a 899 nenosiček. Analýzy přežití byly vyhodnoceny pouze u pacientek s úplnými klinicko-patologickými daty, tedy u 191 nosiček mutací v genu *BRCA1/BRCA2* (151 *BRCA1* a 40 *BRCA2*) a u 680 nenosiček. Výsledky univariačních analýz překvapivě odhalily opačný vliv věku a stavu estrogenových receptorů u nosiček mutací *BRCA1/BRCA2* oproti nenosičkám, kdy pozitivita ER a vyšší věk znamenají negativní prognostické ukazatele u pacientek s mutacemi *BRCA1/BRCA2*. K potvrzení významnosti těchto faktorů jsme provedli

multivariační analýzu, která potvrdila opačný vliv stavu ER na přežívání u nosiček mutací *BRCA1/BRCA2* (negativní faktor, statisticky významný u DFS) a nenosiček (pozitivní prognostický faktor, statisticky významný jak u DFS, tak u DSS). Věk v době diagnózy zůstal významným faktorem pouze u nenosiček, podobně i nízký stupeň diferenciace (statisticky významný pouze v rámci DSS).

Přestože význam dědičných mutací v genech *BRCA1/BRCA2* na vznik dědičné formy karcinomu prsu je zcela nezpochybnitelný a celosvětově byly identifikovány statisíce nosičů mutací, význam prediktivních a prognostických klinicko-patologických faktorů karcinomu prsu byl v této skupině nemocných analyzován pouze okrajově, na malých souborech a s rozporupnými výsledky. Naše studie zahrnující 234 nosiček mutací (čtvrtý nejrozsáhlejší publikovaný soubor vůbec) se jako jedna z mála analýz zaměřila i na hodnocení významu exprese ER, která je určujícím diagnostickým a prognostickým faktorem u pacientek s karcinomem prsu.

Na základě výsledků naší analýzy je nezbytné přehodnotit význam positivity ER u nosiček a nenosiček mutací v hlavních predispozičních genech. Na nosičky mutací *BRCA1/BRCA2* s ER-positivním karcinomem prsu je nezbytné pohlížet jako na skupinu pacientek se zvýšeným rizikem recidivy onemocnění a úmrtí v souvislosti s karcinomem prsu s horší prognózou než u nenosiček mutací mladší 35 let v době diagnózy s ER-negativním karcinomem prsu, které jsou považovány za nejrizikovější populaci. Zároveň práce dokazuje, že prognóza nosiček mutace *BRCA1/BRCA2* s ER-negativním karcinomem prsu (včetně pacientek mladších 35 let) je srovnatelná s prognózou onemocnění u (starších) nenosiček s ER-positivním karcinomem prsu, které jsou považovány za málo rizikové pacientky.

Gen *CHEK2* kóduje kinázu CHK2 zprostředkovávající odpověď na přítomnost dvouřetězcových zlomů v DNA. Zárodečné patogenní mutace v genu *CHEK2*, které v naší populaci pacientek s karcinomem prsu nacházíme po mutacích *BRCA1* a *BRCA2* nejčastěji, byly asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu, nicméně riziko vzniku onemocnění u nosiček mutací *CHEK2* bylo publikováno velmi rozporupně.

V analyzovaném souboru 1,928 vysoce rizikových pacientů a 3,360 nenádorových kontrol bylo identifikováno 10 trunkačních mutací a 26 missense variant, které jsme podrobili funkční analýze pro určení jejich vlivu na kinázovou funkci CHK2. Zatímco frekvence trunkačních mutací se významně lišila mezi souborem pacientů (2,39 % nosičů) a kontrol (0,33 % nosičů;

$p=1,1 \times 10^{-14}$ ), celková frekvence missense alterací byla srovnatelná (4,56 % vs. 3,90 %;  $p=0,42$ ). U zmiňovaných 26 missense variant bylo z hlediska poruchy funkce 11 variant hodnoceno jako varianty s významnou poruchou kinázové aktivity, 5 variant jako s částečnou poruchou funkce a 10 variant prokázalo zachování plné kinázové aktivity.

Riziko spojené s nosičstvím mutací v genu *CHEK2* je klinicky významné pro truncační varianty a vznik karcinomu prsu u žen, ale i u mužů, zatímco asociace s karcinomem ovaria je významná méně a bude vyžadovat analýzu větších souborů, protože prevalence dědičných mutací *CHEK2* je u pacientek s karcinomem ovaria nižší než prevalence u pacientek s karcinomem prsu. Funkčně defektní missense varianty jsou spojeny s pravděpodobně nižším rizikem než truncační mutace. Analýza funkčního významu umožní do budoucna klasifikovat všechny nalezené VUS popsané CZECANCA konsorciem, což zvýší klinickou výpovědní hodnotu analýz u vysoce rizikových pacientů.

Další část mé dizertační práce byla zaměřena na analýzu prognostických faktorů u nemocných s kolorektálním karcinomem. Naším dlouhodobým zájmem je zlepšení stratifikace pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem na základě biochemických markerů v séru, která by napomohla k lepšímu odhadu vhodnosti různých modalit protinádorové péče. Rešerší dostupné literatury jsme identifikovali 32 proteinových markerů spojených s diagnostikou kolorektálního karcinomu, které byly následně vyšetřeny v našem souboru pacientů. Poté byla data analyzována s cílem identifikovat nemocné vhodné pro radikální resekční výkony v oblasti jater, event. v kombinaci s resekcemi primárního tumoru, u kterých by tento přístup vedl k významnému prodloužení celkového přežití. Současně jsme se snažili identifikovat pacienty s velmi špatnou prognózou a malým benefitem z terapie, u kterých je užití kombinovaných terapeutických přístupů diskutabilní.

Dosud vyšly dvě publikace vycházející ze získaných dat. První se věnuje Trefoil faktoru 3 (TFF-3), sekretorickému proteinu produkovanému buňkami sliznice tlustého střeva, který se s největší pravděpodobností podílí na ochraně sliznice před poškozením, stabilizuje hlenovou vrstvu a ovlivňuje hojení epitelu. Z dat získaných analýzou našeho souboru vyplývá, že sérové koncentrace jsou signifikantně vyšší u pacientů s kolorektálním karcinomem, zároveň mají v rámci diagnostiky srovnatelnou sensitivitu a specificitu jako standardně užívaný marker CEA a jejich koncentrace významně koreluje s rozsahem jaterního postižení. Prokázali jsme rovněž dobrou korelaci vstupní koncentrace TFF-3 s prognózou onemocnění. Pacienti s nízkými

sérovými koncentracemi TFF-3 jsou vhodnými kandidáty pro pokus o radikální resekci jaterních metastáz a event. i primárního tumoru (v případě, že již nebyl odstraněn).

Druhá publikace se věnovala dalšímu potenciálnímu sérovému markeru, růstovému/diferenčním faktoru 15 (GDF-15), který vystupuje jako ligand TGF $\beta$  receptorů a účastní se odpovědi tkáně na poškození buněk, zánět nebo hypoxii.

Kromě významného rozdílu koncentrace GDF-15 u pacientů oproti zdravým kontrolám a srovnatelné sensitivity a specificity jako CEA byl zaznamenán výrazný rozdíl u pacientů s ponechaným primárním tumorem střeva nebo lokální recidivou v oblasti střeva a pacientů bez tohoto postižení. Dále byl zaznamenán významný rozdíl mezi pacienty s jaterním postižením oproti pacientům bez jaterního postižení a zároveň sérová koncentrace GDF-15 korelovala s rozsahem jaterního postižení. Vstupní sérová koncentrace GDF-15 korelovala s celkovým přežíváním pacientů.

Součástí práce zaměřené na zpřesnění prediktivních a prognostických faktorů kolorektálního karcinomu bylo zlepšení odhadu rizika relapsu onemocnění na základě detailní imunohistopatologické analýzy primárního ložiska tumoru. Tato analýza se zaměřila na kvalitativní a kvantitativní vyhodnocení přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů a byla řešena v rámci mezinárodního konsorcia Immunoscore. V rámci projektu, který hodnotil vzorky od více než 3500 pacientů s karcinomem kolorekta ve stádiu I-III, jsem na stáži v Erlangu (Pathologisches Institut Universitätsklinikum, Erlangen, Německo) analyzoval parafinové bločky od 250 pacientů z Onkologické kliniky 1. LF UK a VFN) pomocí imunohistochemické analýzy zpracované kalibrovanou kvantitativní a kvalitativní digitální mikroskopií (Immunoscore).

Společná práce potvrdila zásadní prognostický význam poměru specifických subtypů tumor infiltrujících lymfocytů hodnocených v centru tumoru a v oblasti invazivního okraje. Na základě výsledků Immunoscore je možné identifikovat pacienty s vysokým rizikem relapsu onemocnění bez ohledu na mikrosatelitovou nestabilitu.

Zavedení kvantitativního stanovení počtu buněk pomocí softwaru umožňuje dosahovat téměř identických výsledků nezávisle na pracovišti nebo hodnotiteli. Právě tato vlastnost umožňuje široké využití vyšetření Immunoscore v rutinní klinické praxi.

## Pokračování výzkumných projektů

Práce zmíněné v disertaci stále pokračují ve spolupráci s pracovišti na 1.LF a VFN a s partnery na dalších pracovištích v ČR i v zahraničí.

Další výzvou klinického výzkumu u pacientek s dědičnými nádorovými onemocněními budou charakterizace prognostických a prediktivních znaků u pacientek s karcinomem prsu, které nesou dědičné patogenní mutace v nádorových predispozičních genech mimo *BRCA1* a *BRCA2*, a definice klinicko-patologických charakteristik nosičů mutací v nádorových predispozičních genech s dalšími nádorovými onemocněními. V současné době jsme dokončili analýzu těchto genů ve skupině 1333 pacientek s karcinomem ovaria analyzovaných v rámci CZEKANCA konsorcia a publikace výsledků je připravena k odeslání: Soukupova J. et al. *Germline mutations and clinicopathological characteristics of 1,333 ovarian cancer patients* do časopisu JAMA Oncology.

Identifikace prognostických a prediktivních markerů kolorektálního karcinomu rovněž pokračuje. Kromě výše zmiňovaných publikací jsou v současné době v recenzním řízení další dvě publikace zabývající se výsledky analýz kandidátních sérových nádorových markerů získaných v rámci výše zmiňovaného projektu:

Vocka M. et al. *New potential serum markers in metastatic colorectal cancer – Heat shock protein 60 (HSP60), Chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1) and Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2)* v časopise Oncology Letters, IF<sub>2018</sub>=1,664; a

Vocka M. et al. *Serum levels of TIMP-1 and MMP-7 as potential biomarkers in patients with metastatic colorectal cancer* v časopise International Journal Of Biological Markers; IF<sub>2018</sub>=1,449).

Oba články jsou v hodnocení po zaslání připomínek recenzentů po vyžádané revizi.

Nadějné výsledky analýz histopatologických vzorků pomocí Immunoscore bude nezbytné podrobit konfirmačním analýzám. V současné době byly dokončeny analýzy souboru pacientů stádia III a jejich výsledky byly odeslány k recenznímu řízení: Mlecnik B. et al. *Multicenter international SITC study of the consensus Immunoscore for the prediction of survival and response to chemotherapy in Stage III colon cancer* v časopise Journal of Clinical Oncology, IF<sub>2018</sub>=26,303).

Všechny zmíněné aktivity mají potenciál přispět k racionálnější a individualizované léčbě u onkologických pacientů, která je podmínkou pro zlepšení stále neutěšených výsledků léčby nemocných v našem oboru.

## 6 LITERATURA

- Allred D.C. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11(2): 155-168.
- Bae J.M. et al. Prognostic implication of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancers depends on tumour location. *Br J Cancer* 2013; 109(4):1004-1012.
- Begg C.B. et al. Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. *JAMA* 2008; 299(2):194-201.
- Bisgaard M.L. et al. Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 1994; 3(2):121-125.
- Bos A., et al. Treatment and Outcome of Synchronous Colorectal Carcinomas: A Nationwide Study. *Ann Surg Oncol* 2008; 25(2):414-421.
- Bray F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(6):394-424.
- Broca P.P. Traite des Tumeurs. *Paris P. Asselin* 1866.
- Burt R.W. et al. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med* 1995; 46:371-379.
- Consortium. CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 2004; 74(6):1175-1182.
- Couch F.J. et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3(9):1190-1196.
- Cybulski C. et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75(6):1131-1135.
- Cybulski C. et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(28):3747-3752.
- Decker B. et al. Rare, protein-truncating variants in ATM, CHEK2 and PALB2, but not XRCC2, are associated with increased breast cancer risks. *J Med Genet* 2017; 54(11):732-741.
- Desrichard A. et al. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res* 2011; 13(6):R119.
- Douillard J.Y. et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013; 369(11):1023-1034.
- Dufault M.R. et al. Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* 2004; 110(3):320-325.
- Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 2002; 41(3A):154-161.
- Foretova L. et al. Recommended Extension of Indication Criteria for Genetic Testing of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Klin Onkol* 2016;29(Suppl 1):S9-13.
- Foretova L. et al. Recommendation for preventive care in rare genetic cause of breast and ovarian cancer. *Klin Onkol* 2019; 32(Suppl 2), in press.
- Foulkes W.D. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 2008; 359(20):2143-2153.
- Galon J. et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232(2):199-209.
- Gerdes, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1):13-20.

- Girard E. et al. Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing. *Int J Cancer* 2019; 144(8):1962-1974.
- Gnant M. et al. St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care (Basel)* 2011; 6(2):136-141.
- Goldhirsch A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; 24(9):2206-2223.
- Gryfe R. et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(2):69-77.
- Hammond M.E. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2011; 19(6):499-500.
- Han F.F. et al. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2013; 32(6):329-335.
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
- Hauke J. et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med* 2018; 7(4):1349-1358.
- Jenkins M.A. et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4):489-498.
- Jensen E.V., Jacobson H.I. Fate of steroid estrogens in target tissues. In: Pincus G, Vollmer EP, editors. *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*. New York: Academic Press 1960, 161–174.
- Jones J.C. et al. (Non-V600) BRAF Mutations Define a Clinically Distinct Molecular Subtype of Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 2017; 35(23):2624-2630.
- Kassouf E. et al. Anti-EGFR Therapy for Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Extended RAS Gene Mutational Analysis. *BioDrugs* 2016; 30(2):95-104.
- Kill I.R. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci* 1996; 109(Pt 6):1253-1263.
- King M.C. et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 2003; 302(5645):643-646.
- Kleibl Z., Kristensen V.N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast*. 2016;28:136-44.
- Knudson A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(4):820-823.
- Krush A.J. et al. Dermatoglyphics in the Gardner syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1979; 15(6):641-648.
- Kuchenbaecker K.B. et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* 2017; 317(23):2402-2416.
- Kwon J.S. et al. Expanding the criteria for BRCA mutation testing in breast cancer survivors. *J Clin Oncol* 2010; 28(27):4214-4220.
- Lakhani S.R. et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. *Clin Cancer Res* 2000; 6(3):782-789.
- Lanza G. et al. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2006; 24(15):2359-2367.
- Le Calvez-Kelm F. et al. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in CHEK2 contribute to breast cancer susceptibility: results from a breast cancer family registry case-control mutation-screening study. *Breast Cancer Res* 2011; 13(1):R6.

- Lee V., Le D.T. Efficacy of PD-1 blockade in tumors with MMR deficiency. *Immunotherapy* 2016; 8(1):1-3.
- Leopoldo S. et al. Two subtypes of mucinous adenocarcinoma of the colorectum: clinicopathological and genetic features. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(5), 1429-1439.
- Liang M. et al. Association Between CHEK2\*1100delC and Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mol Diagn Ther* 2018; 22(4):397-407.
- Lipson E.J. et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 2013; 19(2):462-468.
- Liu C. et al. The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(4):1355-1360.
- Liu S. et al. Measures of cell turnover (proliferation and apoptosis) and their association with survival in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(6):1716-1723.
- Liu Y. et al. A recurrent CHEK2 p.H371Y mutation is associated with breast cancer risk in Chinese women. *Hum Mutat* 2011; 32(9):1000-1003.
- Lynch H.T. et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104(5):1535-1549.
- Martinez S.R. et al. Medullary carcinoma of the breast: a population-based perspective. *Med Oncol* 2011; 28(3):738-744.
- Miki Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266(5182):66-71.
- Mlecnik B. et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 2016; 44(3):698-711.
- Mlecnik B. et al. The tumor microenvironment and Immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med* 2016; 8(327):327ra326.
- Modest D.P. et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Ann Oncol* 2016; 27(9):1746-1753.
- Moreira L. et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012; 308(15):1555-1565.
- Morganti S. et al. Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol* 2019; 133:171-182.
- Nielsen F.C. et al. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(9):599-612.
- Nurmi A. et al. Recurrent moderate-risk mutations in Finnish breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2019; in press.
- Osborne C.K. et al. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer* 1980; 46(12 Suppl):2884-2888.
- Owens M.A. et al. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 2004; 5(1):63-69.
- Page D.L. et al. Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* 2003; 361(9352):125-129.
- Parry S. et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut* 2011; 60(7):950-957.
- Perkins G. et al. Beyond KRAS status and response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 2014; 15(7):1043-1052.



- Perou C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406(6797):747-752.
- Petersen G.M. et al. Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 1991; 100(6):1658-1664.
- Petrakova K. et al. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Klin Onkol* 2016; 29(Suppl 1):S14-21.
- Pierga J.Y. et al. Long term prognostic value of growth fraction determination by Ki-67 immunostaining in primary operable breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37(1):57-64.
- Pohlmann P.R. et al. Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24):7479-7491.
- Pohlreich P. et al. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 2005; 7(5):R728-736.
- Purdie C.A. et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *Br J Cancer* 2014; 110(3):565-572.
- Rakha E.A. et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(19):3153-3158.
- Rhee Y.Y. et al. CpG Island Methylator Phenotype-High Colorectal Cancers and Their Prognostic Implications and Relationships with the Serrated Neoplasia Pathway. *Gut Liver* 2017; 11(1):38-46.
- Rong C. et al. Estrogen Receptor Signaling in Radiotherapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Studies. *Int J Mol Sci* 2018; 19(3).
- Roth A.D. et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3):466-474.
- Samaan N.A. et al. Estrogen receptor: a prognostic factor in breast cancer. *Cancer* 1981; 47(3):554-560.
- Sampson J.R. et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003; 362(9377):39-41.
- Sanger F. et al. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74(12):5463-5467.
- Shibata D. et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994; 6(3):273-281.
- Schmidt M.K. et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2\*1100delC Carriers. *J Clin Oncol* 2016; 34(23):2750-2760.
- Sieber O.M. et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germline mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348(9):791-799.
- Sinicropo F.A. et al. Prognostic impact of deficient DNA mismatch repair in patients with stage III colon cancer from a randomized trial of FOLFOX-based adjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013; 31(29):3664-3672.
- Sinn H.P., Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel)* 2013; 8(2):149-154.
- Slamon D.J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235(4785):177-182.
- Slavin T.P. et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer* 2017; 3:22.

- Smith C.G. et al. Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy +/- cetuximab. *Clin Cancer Res* 2013; 19(15):4104-4113.
- Soukupova J. et al. CZECA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application-- Design and Optimization of the Targeted Sequencing Panel for the Identification of Cancer Susceptibility in High-risk Individuals from the Czech Republic. *Klin Onkol* 2016; 29(Suppl 1):S46-54.
- Southey M.C. et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet* 2016; 53(12):800-811.
- Systém pro vizualizaci onkologický dat. Dostupných na [www.svod.cz](http://www.svod.cz) (14. 6. 2019).
- Szabo C.I., King M.C. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997; 60(5):1013-1020.
- Terdiman J.P. MYH-associated disease: attenuated adenomatous polyposis of the colon is only part of the story. *Gastroenterology* 2009; 137(6):1883-1886.
- Therkildsen C. et al. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2014; 53(7):852-864.
- Thibodeau S.N. et al. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109):816-819.
- Tsuda H. Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001; 92(12):2965-2974.
- Vahteristo P. et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2):432-438.
- van 't Veer L.J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415(6871):530-536.
- Varricchi G. et al. Cardiotoxicity of immune checkpoint inhibitors. *ESMO Open* 2017; 2(4):e000247.
- Vaughn C.P. et al. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50(5):307-312.
- Venderbosch S. et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin Cancer Res* 2014; 20(20):5322-5330.
- Viale G. et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. *J Clin Oncol* 2008; 26(34):5569-5575.
- Watanabe T. et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2001; 344(16):1196-1206.
- Weisenberger D.J. et al. Association of the colorectal CpG island methylator phenotype with molecular features, risk factors, and family history. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; 24(3):512-519.
- Weischer M. et al. CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26(4):542-548.
- Weischer M. et al. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2\*1100delC. *J Clin Oncol* 2007; 25(1):57-63.
- West M. et al. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 98(20):11462-11467.

- Wooster R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378(6559):789-792.
- Worthley D.L. et al. Gastric adenocarcinoma and proximal polyposis of the stomach (GAPPS): a new autosomal dominant syndrome. *Gut* 2012; 61(5):774-779.
- Yang Y. et al. CHEK2 1100delC variant and breast cancer risk in Caucasians: a meta-analysis based on 25 studies with 29,154 cases and 37,064 controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(7):3501-3505.
- Yokota T. et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(5):856-862.
- Zaanan A. et al. Role of Deficient DNA Mismatch Repair Status in Patients With Stage III Colon Cancer Treated With FOLFOX Adjuvant Chemotherapy: A Pooled Analysis From 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol* 2018; 4(3):379-383.
- Zhang B. et al. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 477-488.
- Zikan M. Gynecological Care and Prevention of Gynecological Malignancies in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Klin Onkol* 2016; 29(Suppl 1):S22-30.

## **7 PŘÍLOHY – vybrané publikované práce *in extenso***